

**Untersuchungen zur Herstellung, Stabilität und Wirkungsweise von kalten  
atmosphärendruckplasmaaktivierten physiologischen Kochsalzlösungen**

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

vorgelegt von

Mareike Alexandra Christine Rostalski (geb. Hänsch)

geboren am 30.04.1982

in Berlin

Greifswald, Januar 2018

Dekan: Professor Dr. Werner Weitschies

1. Gutachter: Professor Dr. Thomas von Woedtke

2. Gutachter: Professor Dr. Jan Benedikt

Tag der Promotion: 28. November 2018





# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
<b>4.1</b>	<b>Plasmaquellen.....</b>	<b>10</b>
4.1.1	<i>Epoxidharz-DBE 1 .....</i>	11
4.1.2	<i>Epoxidharz-DBE 2.....</i>	13
4.1.3	<i>Keramik-basierte DBE .....</i>	15
4.1.4	<i>Atmosphärendruckplasmajet (kINPen09).....</i>	18
<b>4.2</b>	<b>Experimentelles Setup zur Plasmabehandlung von Flüssigkeiten und MO-Suspensionen... 19</b>	
<b>4.3</b>	<b>Plasmadiagnostik.....</b>	<b>20</b>
4.3.1	Optische Emissionsspektroskopie (OES).....	20
4.3.2	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) .....	21
4.3.3	Prüfung auf homogene Plasmaverteilung über die gesamte Elektrodenoberfläche .....	23
<b>4.4</b>	<b>Flüssigkeitsanalyse: pH, Wasserstoffperoxid, Nitrit, Nitrat .....</b>	<b>23</b>
4.4.1	Reagenzien und Chemikalien für die Flüssigkeitsanalyse .....	23
4.4.2	pH-Messung .....	24
4.4.3	Bestimmung des Gehaltes an Wasserstoffperoxid in Wasser und NaCl-Lösung .....	24
4.4.4	Bestimmung des Nitratgehaltes.....	26
4.4.4.1	Bestimmung des Nitratgehaltes in Wasser .....	27
4.4.4.2	Bestimmung des Nitratgehaltes in 0,85 %iger NaCl-Lösung.....	28
4.4.5	Bestimmung des Nitritgehaltes in Wasser und 0,85 %iger NaCl-Lösung .....	29

<b>4.5 Mikrobiologie.....</b>	<b>31</b>
4.5.1 Mikroorganismen für die Untersuchung von Plasmaeffekten.....	32
4.5.1.1 <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	32
4.5.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ).....	34
4.5.1.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ( <i>S. epidermidis</i> ).....	35
4.5.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P. aeruginosa</i> ).....	36
4.5.1.5 <i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> ).....	38
4.5.2 Mikrobiologische Methoden .....	39
4.5.2.1 Reagenzien und Chemikalien für die mikrobiologischen Analysen .....	39
4.5.2.2 Herstellung der verwendeten Nährmedien und Lösungen .....	41
4.5.2.3 Reaktivierung von Bakterientrockenkulturen.....	43
4.5.2.4 Ansetzen einer Übernachtskultur.....	43
4.5.2.5 Herstellung von Bakterienstammsuspensionen.....	44
4.5.2.6 Herstellen einer Verdünnungsreihe .....	44
4.5.2.7 Spatelplattenverfahren.....	45
4.5.2.8 Berechnung der Lebendzellzahl .....	46
4.5.2.9 Berechnung des logarithmischen Reduktionsfaktors .....	46
4.5.2.10 Quantitativer Suspensionsversuch.....	47
4.5.2.11 Methodik zur Transkriptom-Analyse .....	48
4.5.2.11.1 Experimentelles Setup zur Plasmabehandlung von Flüssigkeiten und MO-Suspensionen für die Transkriptom-Analyse.....	48
4.5.2.11.2 Isolierung der Gesamt-RNA .....	48
4.5.2.11.3 One-Color microarraybasierte Genexpressionsanalyse .....	50
4.5.2.11.4 Synthese, Markierung und Amplifikation von cRNA .....	50
4.5.2.11.5 Reinigung und Quantifizierung der markierten und amplifizierten cRNA.....	51
4.5.2.11.6 Hybridisierung der cRNA.....	53
4.5.2.11.7 Waschen der Microarrays .....	54
4.5.2.11.8 Scannen der Microarrays und Extraktion der Daten .....	55

4.5.2.12 Experimentelles Setup zur Bestimmung der Resistenzbildung durch wiederholte Exposition mit plasmabehandelter NaCl-Lösung .....	55
4.5.2.13 Experimentelles Setup zur Bestimmung der Wechselwirkung mit Antibiotika .....	56
4.5.2.14 Experimentelles Setup zur Prüfung der Säureempfindlichkeit von <i>E. coli</i> .....	58
<b>4.6 Statistik und grafische Darstellung .....</b>	<b>59</b>
<b>5 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1 Vergleich der dielektrisch behinderten Oberflächenentladungen.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2 Einfluss des ROS/RNS-Gehaltes auf die antimikrobiellen Effekte eines Plasmajets.....</b>	<b>76</b>
<b>5.3 Betrachtungen zur atmosphärendruckplasmainduzierten Flüssigkeitschemie innerhalb wässriger Lösungen.....</b>	<b>81</b>
<b>5.4 Ausführungen zu den biologischen Wirkmechanismen plasmaassoziierten chemischer Moleküle.....</b>	<b>86</b>
<b>5.5 Plasmabasierte Herstellung, Stabilisierung und Optimierung von antimikrobiell wirksamen Flüssigkeiten .....</b>	<b>89</b>
<b>5.6 Microarraybasierte Genexpressionsanalyse .....</b>	<b>98</b>
5.6.1 SOS-Antwort.....	103
5.6.2 Oxidativer und nitrosativer Stress .....	104
5.6.3 Transporter .....	106
5.6.4 Nitratreduktion und Nitratatmung.....	108
5.6.5 Andere mit Stress in Verbindung stehende Gene .....	109
5.6.6 Regulatorische und stoffwechselassoziierte Gene .....	110
5.6.7 Schlussfolgerungen zum Genexpressionsprofil von <i>E. coli</i> nach CAP-Behandlung .....	110
<b>5.7 Anwendung CAP-behandelter antimikrobiell wirksamer Lösungen.....</b>	<b>112</b>
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>

<b>7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>142</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>11</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>152</b>
<b>12</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
<b>13</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung .....</b>	<b>156</b>
<b>14</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>157</b>



## 2 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
ad.	Lat. adde; Bedeutung: Fülle auf.
b	Schichtdicke
BS	Bakteriensuspension
c	Konzentration
CAP	Atmosphärendruckplasma
CASO	Casein-Soja-Pepton
CDC	Center for Disease Control and Prevention
Cy3	Cyanine 3
DBE	Dielektrischbehinderte Entladung
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$\epsilon$	Molarer Absorptionskoeffizient
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
Gleichung	Gleichung
HV	Hochspannung
IR	Infraroter Spektralbereich
KbE	Koloniebildende Einheiten
LF	Luftfeuchte
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
MO	Mikroorganismus
N	Gitterkonstante
NAP	periplasmatische Nitratreduktase
NAR	respiratorische membrangebundene Nitratreduktasen
nm	Nanometer
NRA	Nitratreduktase A

NRZ	Nitratreduktase Z
OES	Optische Emissionsspektroskopie
PAW	plasmaaktiviertes Wasser
PB	Plasmabehandlung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ppm	Parts per million
Rf	Reduktionsfaktor ( $\log_{10}$ )
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SA	Spezifische Aktivität
SDS	Dodecylsulfat
slm	Standardliter pro Minute
SOD	Superoxiddismutase
T	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$t_1$	Plasmabehandlungszeit in min
$t_2$	Zeitpunkt der Beimpfung in min/Wartezeit
$t_3$	Einwirkzeit in min
UV	Ultravioletter Spektralbereich ( $\lambda = 200\text{-}380\text{ nm}$ )
VF	Verdünnungsflüssigkeit
VIS	Sichtbarer Spektralbereich ( $\lambda = 380\text{-}790\text{ nm}$ )
WHO	World Health Organization
$\lambda$	Wellenlänge

### 3 Einleitung

Bei der Plasmamedizin handelt es sich um ein schnell wachsendes, innovatives und interdisziplinäres Forschungsgebiet, das sowohl unterschiedliche Lebenswissenschaften als auch Bereiche der klinischen Medizin mit der klassischen Plasmaphysik in einem neu ausgerichteten Themenkomplex vereint<sup>(1, 2)</sup>. Das Prinzip der plasmamedizinischen Therapie beruht auf der Erzeugung von sogenannten kalten Atmosphärendruckplasmen („cold atmospheric plasma“, CAP) und deren Anwendung am Menschen für therapeutische Zwecke<sup>(3)</sup>. Um das Prinzip dieser physikalisch basierten Technologie gut nachvollziehen zu können, ist es von Vorteil, zunächst den Begriff Plasma zu definieren und die Besonderheiten zu erläutern.

Im Allgemeinen ist ein Plasma ein teilweise oder vollständig ionisiertes Gas<sup>(1, 4)</sup>. Es wird häufig nach den Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig auch als vierter Aggregatzustand der Materie bezeichnet<sup>(4-7)</sup>. Ein Plasma besteht aus Elektronen, Ionen und Neutralteilchen, die im Grund- oder angeregtem Zustand vorliegen können<sup>(4)</sup>. Aufgrund der unterschiedlichen freien Ladungsträger ist es elektrisch leitend, auch wenn es in seiner Gesamtheit elektrisch neutral ist<sup>(6)</sup>. Plasma emittiert unterschiedliche elektromagnetische Strahlungen wie zum Beispiel UV, infrarotes oder sichtbares Licht<sup>(1, 3)</sup>. Technisch wird ein Plasma gebildet, indem einem Gas Energie in Form von Wärme, einer elektrischen Spannung oder eines magnetischen Feldes zugeführt wird<sup>(4)</sup>. Die eingespeiste Energie führt dazu, dass aus Atomen und Molekülen angeregte Spezies und Ionen gebildet werden.

Da Plasma in unterschiedlichen Formen existieren kann, wird es physikalisch in unterschiedliche Klassen unterteilt<sup>(6)</sup>. Die Klassifizierung erfolgt zunächst über den Druck, bei dem das Plasma generiert wird. So wird zwischen Niederdruckplasmen, Atmosphärendruckplasmen und Hochdruckplasmen unterschieden<sup>(6)</sup>. Nachfolgend erfolgt die Klassifizierung über das thermische Gleichgewicht. Hierbei wird zwischen thermischen und nicht-thermischen/kalten Plasmen unterschieden<sup>(1, 6)</sup>. Beim thermischen Plasma haben Moleküle, Ionen und Atome die gleiche Temperatur wie die Elektronen<sup>(1)</sup>. Die Gastemperatur von thermischen Plasmen ist im Allgemeinen sehr hoch und nicht für die Anwendung auf thermolabilen Materialien geeignet. Bei kalten Plasmen haben die Elektronen eine deutlich höhere Temperatur als die anderen Gasmoleküle, wodurch die Gastemperatur insgesamt niedrig ist und bis auf Raumtemperatur abgesenkt werden kann<sup>(6, 8)</sup>. Mit dieser Eigenschaft können kalte Plasmen auf thermolabilen Materialien und sogar auf vitalem Gewebe angewendet werden. Zudem ist diese Form des Plasmas leicht an komplexe Geometrien anpassbar<sup>(8)</sup>. Aufgrund der geringen Temperatur und hohen Plastizität verfügen kalte Plasmen über ein breites Anwendungsspektrum. Sie werden zum Beispiel als Lichtquellen, zur Beseitigung von Gasverschmutzungen, zur Oberflächenmodifikation

oder zu Dekontaminationszwecken angewendet<sup>(8)</sup>. Neben der technischen Anwendung von kalten Plasmen werden sie zunehmend auch in anderen Bereichen wie z.B. den Lebenswissenschaften eingesetzt. Daher ist es nicht verwunderlich, dass CAP bereits im Jahr 2004 eine beachtliche Bedeutung und Zukunft bei der Anwendung für medizinische, biotechnologische oder pharmazeutische Zwecke vorhergesagt wurde<sup>(1)</sup>. Heute spiegelt sich die Richtigkeit dieser Annahme in der aufstrebenden Forschung der Plasmamedizin wieder. So wurden inzwischen erste CAP-Quellen als Medizinprodukt zur therapeutischen Anwendung zugelassen (s. Abbildung 1).

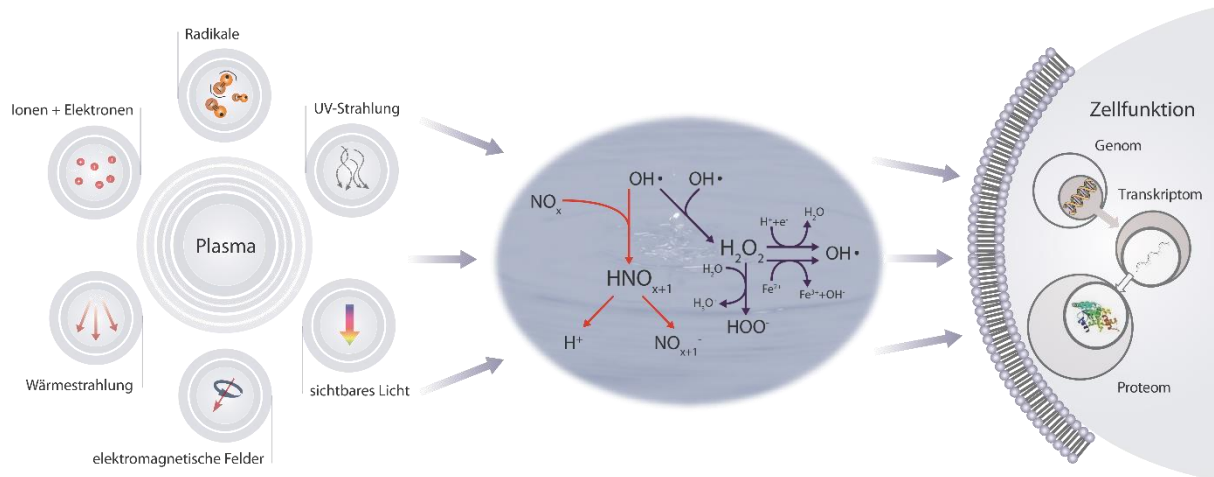


**Abbildung 1: Beispiele zweier bereits als Medizinprodukt zugelassener Plasmaquellen. Links: PlasmaDerm (Bildquelle: ©Cinogy GmbH, [http://www.cinogy.de/\\_DE/index.php](http://www.cinogy.de/_DE/index.php)), rechts: kINPenMed (Bildquelle: ©neoplas tools GmbH, <http://www.neoplas-tools.eu/patienten.html>).**

Die plasmamedizinische Grundlagenforschung konzentriert sich mit Hilfe von Jetplasmen, dielektrisch behinderten Entladungen (DBE) und Koronaentladungen einerseits auf die Aufklärung der Wirkung auf lebendes Gewebe sowie andererseits auf die Aufklärung der Wirkmechanismen in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen<sup>(1)</sup>. Der derzeitige Stand der Forschung zu den grundlegenden biologischen Wirkmechanismen kann weitestgehend durch die nachfolgenden beiden Kernaussagen abgebildet werden:

1. Biologische Plasmaeffekte werden zu einem großen Teil über die Veränderung der flüssigen Zellumgebung vermittelt<sup>(3)</sup>.

2. Biologische Plasmaeffekte basieren überwiegend auf der Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) und reaktiven Stickstoffspezies („reactive nitrogen species“ [RNS]/„reactive oxygen and nitrogen species“ [RONS]), die aus der Plasma-/Gasphase in die flüssige Zellumgebung eingetragen und/oder durch Plasmabehandlung in der flüssigen Phase generiert werden<sup>(3, 9)</sup>.



**Abbildung 2: Die flüssigkeitsvermittelte Wirkung des Plasmas auf die Zelle (Bildquelle: ©INP Greifswald).**

Die antimikrobielle Wirkung wie auch die Wirkung auf Säugetierzellen von CAP wird jedoch nicht komplett auf RNS und ROS zurückgeführt. Wie in Abbildung 2 dargestellt, beruhen die Wirkungen auch auf anderen Plasmabestandteilen, wie z.B. positiv bzw. negativ geladenen Ionen, freien Elektronen, angeregten Spezies, UV-Strahlung und elektromagnetischen Feldern<sup>(8, 10-12)</sup>. Eine exakte Identifizierung der Wirkmechanismen sowie der wirksamen Plasmabestandteile sind weiterhin Gegenstand der Forschung<sup>(8)</sup>. Es sind derzeit viele verschiedene Plasmaquellen in der experimentellen und praktischen Anwendung, die alle mit individuellen Parametern betrieben werden. Dadurch ist die jeweilige chemische Zusammensetzung des Plasmas in einer gewissen Art gerätespezifisch. Das heißt, die biologisch wirksamen Agenzien sind nicht zwangsläufig bei jeder Plasmaquelle identisch. Sie müssen viel eher für jede Anlage neu identifiziert werden<sup>(8)</sup>. Die individuelle Plasmachemie kann darüber hinaus zu spezifischen biologischen Synergien zwischen den unterschiedlichen reaktiven Agenzien führen, was als positiver Nebeneffekt eingestuft werden kann.

Neben der Grundlagenforschung ist die Plasmamedizin stark anwendungsorientiert ausgerichtet<sup>(9)</sup>. Basierend auf der nachgewiesenen bakteriziden und bakteriostatischen Wirkung von CAP entstand die Idee, kalte Plasmen zur Behandlung von kritisch infizierten chronischen Wunden anzuwenden<sup>(6)</sup>. Zudem deckten weitere Arbeiten im Bereich der Grundlagenforschung auf, dass neben der Keimreduzierung auch das Wachstum von Hautzellen und somit die Regeneration

der geschädigten Haut stimuliert werden kann<sup>(13-15)</sup>. Daher wurden erste klinische Studien für die Behandlung von chronischen Wunden und Ulzera (offenes Bein) bereits durchgeführt<sup>(9, 16-18)</sup>. Auch auf dem Gebiet der Hautdesinfektion kann von Einzelfallstudien berichtet werden, die in den entsprechenden Fachkreisen vorgestellt wurden<sup>(9, 19)</sup>. Nicht nur die dermatologische Anwendung von CAP erscheint vielversprechend. Weitere potentielle Anwendungsmöglichkeiten sind sowohl in der Zahnmedizin als auch in der Onkologie zu erwarten<sup>(9, 20)</sup>. Im Bereich der zahnmedizinischen Forschung wurden mit CAP vielversprechende Ergebnisse bei der Deaktivierung von Biofilmen auf Zahnoberflächen, der Oberflächenmodifikation von Implantaten und beim Bleichen von Zähnen erzielt<sup>(20)</sup>. Studien in der Onkologie zeigen, dass eine CAP-Einwirkung mit geringerer Intensität (Einwirkungszeit) das Wachstum von Tumorzellen stoppen und in hohen Konzentrationen deren Zelltod induzieren kann, letzteres sogar effektiver als die heutigen Standardtherapien<sup>(21)</sup>. Die höchsten Erfolgchancen für eine therapeutische Anwendung von CAP im medizinischen Bereich werden derzeit jedoch der Dermatologie und der plastischen sowie ästhetischen Chirurgie zugeschrieben<sup>(22)</sup>.

Auch bei den hier aufgeführten Anwendungsbeispielen gilt die Kernaussage, dass die flüssige Zellumgebung eine zentrale Rolle bei der Wirkung von CAP einnimmt. Diese Schlüsselfunktion wurde durch die Arbeiten verschiedener Forschungsgruppen hinreichend nachgewiesen, welche zeigen, dass durch Plasmabehandlung Flüssigkeiten, wie z.B. Wasser, NaCl-Lösungen und Zellkulturmedien, selbst mit biologischer Aktivität ausgestattet werden können<sup>(15, 23-39)</sup>. Basierend auf diesen Ergebnissen und den oben genannten Kernaussagen des Forschungsstandes wird von einem Teil der plasmamedizinischen Gemeinschaft zwischen zwei Behandlungsregimen ("direkt" und "indirekt") unterschieden. Bei der "direkten" Behandlung werden Zellen oder Mikroorganismen im entsprechenden Medium suspendiert bzw. – im Falle adhärenter Zellkulturen – in Kontakt mit dem Medium kultiviert, im nächsten Schritt mit CAP behandelt und anschließend hinsichtlich ihrer biologischen Antwort analysiert. Im zweiten Fall wird von einer "indirekten" Plasmabehandlung gesprochen. Hierbei wird das flüssige Medium zuerst mit CAP behandelt, im Anschluss mit Zellen oder Mikroorganismen in Kontakt gebracht und nach einer entsprechenden Einwirkzeit wird die biologische Antwort bestimmt<sup>(13, 15, 28, 29, 32, 33, 37-46)</sup>. Das Prinzip der "indirekten" Plasmabehandlung wurde ursprünglich für nicht gepufferte wässrige Lösungen, wie z.B. NaCl-Lösungen oder Wasser, angewendet, welche wiederum auf hochkonzentrierte Bakteriensuspensionen appliziert wurden<sup>(28, 29, 32, 33, 46-48)</sup>. Demzufolge sind die ersten dokumentierten Ergebnisse der "indirekten" Behandlung antimikrobielle Effekte. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, welche die antimikrobielle Wirkung und die chemischen Prozesse von sogenanntem plasmaaktiviertem Wasser (PAW)

untersuchten<sup>(32, 33, 46-49)</sup>, während die antimikrobielle Wirkung und die chemischen Eigenschaften von plasmaaktivierten NaCl-Lösungen von Oehmigen *et al.*<sup>(28, 29, 49)</sup> erforscht wurden.

Da plasmaaktivierte NaCl-Lösungen in der Vergangenheit nachweislich nur wenig erforscht wurden, sollen die dargestellten Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich dazu dienen, die Mechanismen der über NaCl-Lösung vermittelten biologischen Plasmawirkung weiter aufzuklären. Zudem sollten osmotisch wirksame Effekte (osmotischer Stress), die einen Einfluss auf die Zellvitalität der verwendeten Mikroorganismen haben können, durch die Verwendung von NaCl-Lösung als Suspensionsmittel ausgeschlossen werden. Auf Grund der zunehmenden Resistenzen von Mikroorganismen gegenüber Desinfektionsmitteln<sup>(50, 51)</sup> und antibiotisch wirksamen Substanzen<sup>(52, 53)</sup>, fokussieren sich diese Untersuchungen ebenfalls, wie bei Oehmigen *et al.*<sup>(28, 29, 54)</sup>, auf die antimikrobielle Wirksamkeit von Plasma. Neben der Aufklärung der Wirkmechanismen soll zudem geprüft werden, ob plasmabehandelte NaCl-Lösungen das Potential haben, praktische (medizinische) Anwendung zu finden, wie z. B. zur allgemeinen Desinfektion im Bereich der Infektions- und Krankenhaushygiene oder zur Wundreinigung. Letzteres ist ein weiterer Grund, weshalb die Wahl der Prüflösung auf eine einfache physiologische, 0,85 %ige NaCl-Lösung fiel. Die Vorteile liegen klar auf der Hand: physiologische NaCl-Lösung weist kein toxisches Potential auf, ruft keinerlei Reizungen oder allergische Reaktionen hervor, ist allgemein verfügbar und in der Anschaffung kostengünstig<sup>(49, 55, 56)</sup>. Vor allem aber wird sie neben dem Klassiker Wasser zur traditionellen Reinigung von Ulzera und Wunden verwendet<sup>(49, 55-58)</sup>.

Die von Oehmigen *et al.*<sup>(27-29, 54)</sup> verwendete dielektrisch behinderte Oberflächenentladung (DBE) ist eine etablierte Experimentalanlage, die durch ihren Aufbau für die Untersuchungen von biologischen Plasmaeffekten besonders gut geeignet ist. Die Einbettung der flächigen DBE in den Deckel einer handelsüblichen Petrischale erlaubt die Behandlung von Zellkolonien auf Agarplatten, Mikroorganismen (MO) in Suspensionen und MO-freien Flüssigkeiten. Der große Vorteil dieser Plasmaanlage liegt in der gleichzeitigen und gleichmäßigen Behandlung einer festgelegten Oberfläche. Ein Abscannen der Behandlungsfläche, wie bei den in der plasmamedizinischen Gemeinschaft vielfach angewendeten Jetplasmen, ist nicht erforderlich. Nachteilig wirken sich jedoch die verwendeten Materialien auf die Plasmaquelle aus. Die DBE besteht aus einer epoxidharzhaltigen Leiterplatte, in die Kupferelektroden implementiert sind. Das Epoxidharz übernimmt hierbei die Funktion des Dielektrikums und ist der Grund, warum die Plasmaquelle in der vorliegenden Arbeit auch als epoxidharzbasierte DBE bezeichnet wird. Da die Zündung des Plasmas zur plasmainduzierten Korrosion der HV-Kupferelektrode (High Voltage, Starkstrom) führt, ist es notwendig, diese vor Inbetriebnahme mit einem

acrylharzbasierten Schutzlack (Plastik 70; CRC Industries Deutschland GmbH) zu bedecken. Aufgrund der Wechselwirkung von Plasmabestandteilen mit dem Lack kann die Schutzfunktion nur temporär aufrechterhalten werden. Nach einer Betriebsdauer von 45 min muss der aufgetragene Schutzlack mit Hilfe von Aceton entfernt und erneuert werden. Neben dieser Einschränkung in der Anwendung der Plasmaanlage besteht ein mögliches Risiko, dass während des Betriebes unbekannte chemische und eventuell auch toxische Nebenprodukte entstehen und in die Proben eingetragen werden. Daher wurde ein Nachfolgemodell, hier auch als keramikbasierte DBE bezeichnet, mit gleicher geometrischer Anordnung, aber unterschiedlichen Materialien entwickelt. Die epoxidharzbasierte Leiterplatte wurde durch eine Keramikscheibe ersetzt, die Elektroden aus einer silber- und platinhaltigen Paste angefertigt und in das neue Dielektrikum implementiert. Zum Schutz der HV-Elektrode wurde diese mit einer permanenten Glaskeramikscheibe abgedeckt, wodurch das Auftragen eines Schutzlackes obsolet ist. Die vorgenommenen Materialanpassungen führten zu einer gesteigerten Elektrodenstabilität und erlaubten somit eine Langzeitanwendung von ein und derselben Elektrode. Zusätzlich wurde das Elektrodengehäuse der keramikbasierte DBE mit einem Gaszu- und abfluss versehen, was Experimente mit anderen Arbeitsgasen als (stehender) Umgebungsluft ermöglicht. Aufgrund der veränderten Materialien und der zusätzlichen Anpassungen sind auch andere elektrische Ansteuerungsparameter (z. B. die Spannung oder Frequenz) erforderlich gewesen, um ein homogenes und stabiles Plasma auf der Elektrodenoberfläche zu erzeugen.

Wie bereits oben erwähnt, ist die jeweilige chemische Zusammensetzung des Plasmas in einer gewissen Art gerätespezifisch. Aus diesem Grund war das erste Ziel dieser Arbeit eine vergleichende Charakterisierung epoxidharzbasierter und keramikbasierter DBE. Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob und inwieweit Materialveränderungen sowie Änderungen der technischen Parameter Einfluss auf die "Performance" einer ansonsten geometrisch gleichen Plasmaquelle haben. Die hierfür durchgeführten Untersuchungen erfolgten auf den nachfolgenden drei Ebenen: Plasma, Flüssigkeit und (MO-)Zelle.

Die Plasma-/Gasphase wurde klassischerweise mit Hilfe der optischen Emissionsspektrometrie (OES) sowie der Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) physikalisch bzw. plasmadiagnostisch untersucht. Bei der Flüssigkeitsanalytik kamen leicht zugängliche nass-chemische Analyseverfahren, die üblicherweise auch von der internationalen plasmamedizinischen Forschungsgemeinschaft angewendet werden, zum Einsatz<sup>(23, 26-29, 32, 47, 54, 59, 60)</sup>. Erfasst wurden stabile und gut zugängliche Parameter wie der pH-Wert als allgemeines Charakteristikum der reaktiven Umgebung, Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) als repräsentative Marker für die plasmainduzierte RNS-Chemie und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) als Repräsentant



für die ROS-Chemie<sup>(23, 26-29, 32, 47, 54, 59, 60)</sup>. Die biologische Leistung der beiden Plasmaanlagen wurde exemplarisch anhand der Inaktivierung von MO in Suspensionen ermittelt<sup>(27-29, 54)</sup>.

Neben der Charakterisierung der beiden Anlagen sollte die Aufklärung der über die Flüssigkeit vermittelten Wirkmechanismen bzw. Identifizierung der in der Flüssigkeit wirksamen Spezies das zweite Ziel dieser Arbeit sein. Die Übersichtsarbeiten von Jablonowski *et al.*<sup>(61)</sup> und Bruggemann *et al.*<sup>(62)</sup> haben klar und ausführlich dargelegt, dass die Analytik der (weitestgehend instabilen) reaktiven Spezies in Flüssigkeiten sehr aufwendig ist und bisher nur teilweise erfolgreich war. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit drei sich ergänzende Untersuchungsansätze verfolgt, die weiteren Aufschluss über die chemischen Vorgänge bzw. Wirkungsmechanismen von flüssigkeitsvermittelten Plasmaeffekten herbeiführen sollten. Mit Hilfe des ersten Ansatzes wurde in erster Linie untersucht, welchen Einfluss die Abwandlung des Arbeitsgases auf die chemischen Eigenschaften einer plasmabehandelten wässrigen Phase hat. Hierzu wurde zunächst die DBE in einer reinen Argon-Atmosphäre gezündet, was jedoch nur durch entsprechende Anpassungen im Bereich der elektrischen Betriebsparameter realisiert werden konnte. Trotzdem zeigten diese Versuche, dass der Ausschluss von Stickstoff und Sauerstoff einen maßgeblichen Einfluss auf die chemischen Eigenschaften der untersuchten Flüssigkeit hat. Das Arbeitsgas spielt demzufolge hierbei eine entscheidende Rolle. Basierend auf diesem Erkenntnis sollte weiterführend untersucht werden, ob Zumischungen von reinem Stickstoff bzw. Sauerstoff oder Variationen von Stickstoff/Sauerstoff-Gemischen die chemischen Eigenschaften einer plasmabehandelten Flüssigkeit signifikant verändern. Neben den chemischen Parametern sollte zudem geprüft werden, ob die unterschiedlichen Arbeitsgase die biologischen Plasmaeffekte ebenfalls beeinflussen. Zur Klärung dieser spezifischen Fragestellungen waren die hier hauptsächlich genutzten DBE nicht anwendbar, da mit jeder Arbeitsgasänderung auch eine individuelle Anpassung der elektrischen Betriebsparameter notwendig wurde. Anderenfalls war es nicht möglich, unter allen Bedingungen ein homogenes und stabiles Plasma über die gesamte Elektrodenfläche zu generieren. Deshalb sind die angedachten DBE-Versuche, bei denen mit unterschiedlichen Arbeitsgasen gearbeitet werden sollte, nur begrenzt miteinander vergleichbar. Aus diesem Grund wurden die technisch sehr schwer umzusetzenden arbeitsgasrelevanten Fragestellungen an dieser Stelle ausnahmsweise nicht mit einer der beiden DBE, sondern mit einem argonbetriebenen Plasmajet bearbeitet. Dieser Argon-Jet verfügte über eine äußere Vorrichtung (Glashülle, s. Abbildung 12), die es ermöglichte, die unmittelbare Gasumgebung des Plasmajets mit Hilfe eines Mantelgases zu kontrollieren bzw. zu modifizieren sowie den Jet bei konstanten elektrischen Ansteuerungsparametern zu betreiben<sup>(35)</sup>. Die mit dem Plasmajet und unterschiedlichen Arbeitsgasen behandelten Proben wurden einer

Flüssigkeitsanalytik unterzogen und die biologischen Plasmaeffekte exemplarisch anhand der Inaktivierung von MO in Suspensionen bestimmt.

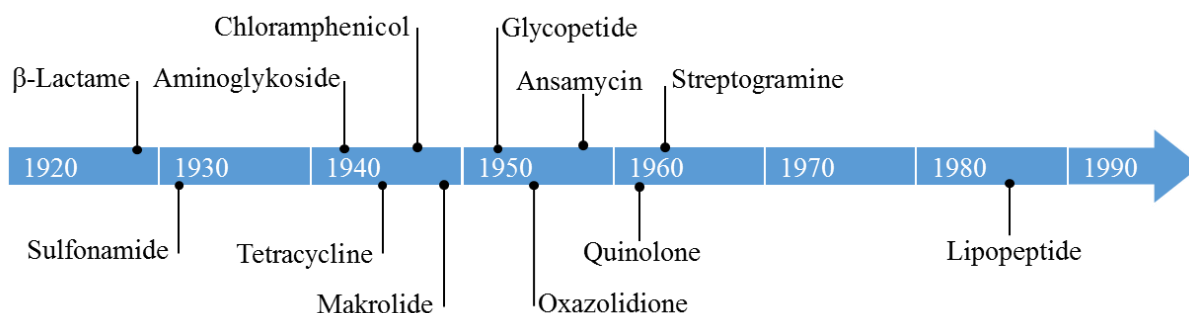
Da, wie bereits oben erwähnt, Flüssigkeiten durch Plasmabehandlung selbst biologische Aktivität erlangen, sollte beim zweiten Ansatz die "indirekte" Plasmabehandlung im Fokus der Analyse stehen. In diesem Rahmen wurde anhand von plasmabehandelten NaCl-Lösungen die Stabilität der biologischen (antimikrobiellen) Wirksamkeit untersucht. Es sollte zudem geklärt werden, ob bzw. inwieweit stabile oder zumindest vorübergehend stabile chemische Spezies für die biologische Wirksamkeit verantwortlich sein können. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde, analog zu der Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit von plasmabehandelten NaCl-Lösungen, über einen definierten Zeitraum nach erfolgter Plasmabehandlung eine klassische Flüssigkeitsanalytik durchgeführt.

Mit dem dritten Ansatz sollten die plasmainduzierten Wirkmechanismen auf MO-Ebene untersucht werden, indem die biologische Reaktion nicht nur wie bisher durch den lebend/tot-Nachweis bestimmt, sondern mit Hilfe der RNA-Genexpressionsanalyse (Transcriptomics) auf zellulärer Ebene analysiert wurde.

Da sowohl Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, als auch die Vorversuche der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, dass mit Hilfe einer Plasmabehandlung antimikrobiell wirksame Flüssigkeiten hergestellt werden können, war das letzte und dritte Ziel dieser Arbeit die weitere Aufklärung der möglichen Anwendungsbedingungen von plasmabehandelten NaCl-Lösungen. Die Suche nach einer Anwendungsnische für diese Lösungen war der Leitfaden für diese Untersuchungen. Hierbei wurde die Grundidee verfolgt, wenn anwendungstechnisch möglich, Antibiotika im Idealfall durch plasmabehandelte antimikrobiell wirksame NaCl-Lösungen zu ersetzen, was auf Grund der zunehmenden Antibiotikaresistenzen ein ausgesprochen erstrebenswertes Ziel ist.

Die Entdeckung des Penicillins im August 1928 durch Alexander Fleming war zu dieser Zeit ein Durchbruch fast unbeschreiblichen Ausmaßes<sup>(63, 64)</sup>. Penicillin ist das erste und wohl bekannteste Antibiotikum der Welt<sup>(64)</sup>. In den 1940er Jahren, während des zweiten Weltkrieges, war es die beste Waffe zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten<sup>(63)</sup>. Seine Entdeckung und die Weiterentwicklung zur therapeutischen Anwendung sind zusammen einer der wichtigsten Meilensteine in der Medizin<sup>(63)</sup>. Zwischen 1950 und 1960 folgte das sogenannte ‚goldene Zeitalter‘ der Antibiotika<sup>(65)</sup>. Es wurden zahlreiche neue Wirkstoffe entdeckt, die zur Hälfte noch heute im therapeutischen Gebrauch sind<sup>(65)</sup>. Unglücklicherweise hat der intensive prophylaktische und teilweise unkritische therapeutische Gebrauch in der Schulmedizin und die großzügige Gabe von Antibiotika für die Wachstumsförderung in der Tierzucht dazu geführt, dass sich viel

zu schnell resistente Pathogene entwickelten<sup>(65, 66)</sup>. Die Entstehung von Resistenzen ist ein natürlicher, evolutionsbedingter Entwicklungsprozess in Mikroorganismen, der erstzunehmende Konsequenzen mit sich bringt<sup>(53, 66)</sup>. Das CDC (Center for Disease Control and Prevention in Atlanta, Georgia) berichtete 2013, dass ca. zwei Millionen Menschen in den USA an antibiotikaresistenten Infektionen erkrankten<sup>(67)</sup>. Die jährlichen Kosten im amerikanischen Gesundheitssystem für die Therapie dieser Infektionen belaufen sich laut WHO (World Health Organization mit Sitz in der Schweiz) auf 21-34 Milliarden US Dollar (Stand 2014), begleitet von acht Millionen zusätzlichen Tagen im Krankenhaus<sup>(53)</sup>. Bei mindestens 23.000 Patienten zeigte sich 2013 ein tödlicher Krankheitsverlauf<sup>(67)</sup>. Antibiotikaresistenzen sind ein lebensbedrohliches Problem.



**Abbildung 3: Zeitstrahl der Antibiotikaentdeckungsgeschichte<sup>(68)</sup>**

Abbildung 3 zeigt anhand einer Zeitachse die Entdeckungsgeschichte von heute bekannten Antibiotikaklassen. Es wird ersichtlich, dass die letzte neue Klasse in den 1980iger Jahren entdeckt wurde<sup>(53)</sup>. Der seit mehreren Jahrzehnten anhaltende Mangel an Neuentdeckungen und Weiterentwicklungen steht im großen Gegensatz zu den alarmierend schnell ansteigenden Antibiotikaresistenzen. Es ist dringend notwendig antibiotisch wirksame Alternativen zu entwickeln. Anderenfalls kann davon ausgegangen werden, dass sich die Schulmedizin bei der Behandlung von Infektionskrankheiten bzw. infiziertem Gewebe auf kurz oder lang auf dem gleichen Stand befinden wird wie vor der Entdeckung des Penicillins.

Dieser kurze Abriss der Geschichte der Antibiotika und die Darlegung der Problematik der Antibiotikaresistenzen zeigen (nochmals sehr) deutlich, dass die oben genannte Idee, Antibiotika zumindest in ausgewählten Fällen durch antimikrobiell wirksame NaCl-Lösungen zu ersetzen, (durchaus) ein erstrebenswertes Ziel ist. Daher sollte neben der Lagerstabilität, die im Rahmen von Aufgabe zwei bereits analysiert wurde, an dieser Stelle die Möglichkeit der Resistenzbildung bei wiederholter Exposition untersucht werden. Zudem sollte geprüft werden, ob es bei einer Kombination von plasmabehandelten NaCl-Lösungen mit klassischen

Antibiotika zu möglichen Interaktionen kommt. Diese Information ist für die praktische Anwendung besonders wichtig, da es häufig vorkommt, dass zwei Therapien miteinander kombiniert werden um einen größeren Therapieerfolg zu erzielen. Neben der eventuellen Steigerung des Therapieerfolges ist es zudem von grundlegender Bedeutung zu wissen, ob die beiden Methoden überhaupt miteinander kombiniert werden können, oder ob die Kombination im schlimmsten Fall zu einer reduzierten oder gar keiner Wirkung eines Kombinationspartners führt.

Zusammenfassend war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit die weitere Aufklärung der Wirkmechanismen von flüssigkeitsvermittelten Plasmaeffekten. Um einen möglichst weiten Einblick in diese Prozesse zu erhalten, wurden, wie bereits oben beschrieben, mehrere breitgefächerte Lösungsansätze verfolgt. Die erste Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu untersuchen, welchen Einfluss die Verwendung von unterschiedlichen Materialien und elektrischen Ansteuerungsparametern auf die 'Performance' von zwei geometrisch gleichen Oberflächen-DBE hat. Mit der zweiten Aufgabe wurde der Fokus auf die Aufklärung der flüssigkeitsvermittelten Wirkmechanismen bzw. der Identifizierung von wirksamen Spezies in Flüssigkeiten gelegt. Hierbei wurden drei sich ergänzende Untersuchungsansätze gewählt. Der erste Ansatz diente der Bestimmung des Einflusses des verwendeten Arbeitsgases auf die Zusammensetzung der flüssigen Phase sowie der biologischen Plasmaeffekte. Im Rahmen des zweiten Ansatzes sollte die biologische bzw. antimikrobielle Stabilität von plasmabehandelten NaCl-Lösungen genauer untersucht werden. Ansatz Nummer drei widmete sich der Analyse der Wirkungsmechanismen auf Ebene der Mikroorganismen. Die biologische Antwort wurde hier nicht durch einen lebend/tot-Nachweis bestimmt, sondern mit Hilfe der Genexpressionsanalyse detailliert untersucht. Die dritte Aufgabe der vorliegenden Arbeit diente der weiteren Klärung möglicher Anwendungsbedingungen von plasmabehandelten NaCl-Lösungen. Mit diesen Voruntersuchungen sollte eine richtungsweisende Basis für weiterführende Studien gelegt werden, die eine zukünftige Anwendung von plasmabehandelten NaCl-Lösungen in medizinischen Bereichen als Zielstellung verfolgen.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Plasmaquellen**

Für die Untersuchungen standen zwei unterschiedliche dielektrisch behinderte Oberflächenentladungen (DBE) und ein Plasmajet (kINPen09) zur Verfügung, die sich durch ihren Aufbau und ihre elektrische Ansteuerung unterschieden. Beim kINPen09 wird eine Kapillare von einem Arbeitsgas (z.B. Argon) durchströmt. Mit Hilfe einer die Kapillare umschließenden

Ringelektrode und einer in der Kapillare befindlichen Nadelelektrode wird das Plasma innerhalb der Kapillare erzeugt und durch den Gasfluss des Arbeitsgases hinausgetrieben. Dieses auch als „Effluent“ bezeichnete austretende Plasma kann auf die zu behandelnde Oberfläche gerichtet werden<sup>(3)</sup>, wodurch eine gezielte, punktförmige und gleichmäßige Behandlung selbst von stärker strukturierten Flächen, sowie Vertiefungen und Hohlräume möglich ist. Nachteilig wirkt sich diese Eigenschaft jedoch bei der Behandlung von größeren Flächen aus. Hierbei muss der kINPen09 nämlich systematisch über das zu behandelnde Areal geführt werden, was je nach Flächengröße mit entsprechendem höheren Zeitaufwand verbunden ist<sup>(3)</sup>. Im Vergleich zum kINPen09 wird bei der DBE das Plasma nicht in einer Kapillare, sondern auf der Oberfläche der Hochspannungselektrode (HV-Elektrode, s. Abbildung 4) eines kreisrunden Elektrodensystems erzeugt, das auf einer flachen Scheibe aufgebracht ist. Dies ermöglicht die großflächige und homogene Behandlung von Zielstrukturen, wobei der Zeitaufwand verhältnismäßig geringgehalten wird. Die Größe der Behandlungsfläche wird hierbei durch die Größe der Elektrode definiert/limitiert.

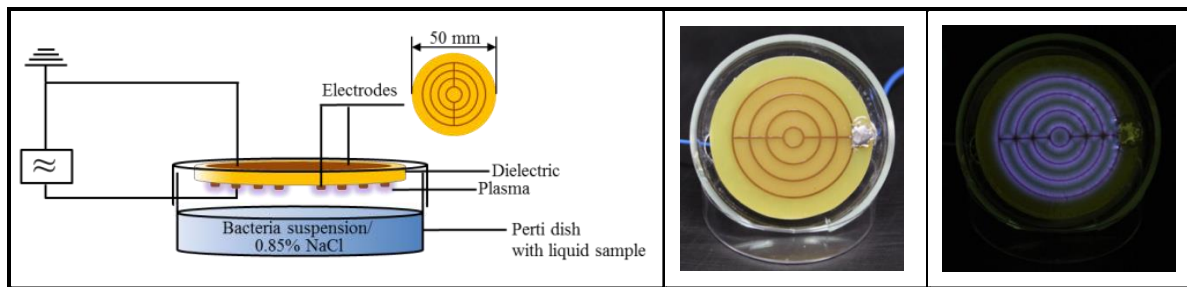
#### **4.1.1 Epoxidharz-DBE 1**

##### *a. Geometrischer Aufbau des Elektrodensystems*

Das kreisrunde Elektrodensystem ist in einem Deckel eingebettet, welcher exakt auf die untere Schale einer Petrischale (Ø 55 mm) aufsetzen kann (s. Abbildung 4). Das Elektrodensystem besteht aus einer 1,5 mm dicken Scheibe aus einem kommerziell erhältlichen epoxidharzbasierten Leiterplattenmaterial, das beidseitig mit einer 1,5 µm dicken Kupferschicht versehen ist. Das Epoxidharz fungiert als Dielektrikum. Auf einer Seite wird eine Elektrodenstruktur, bestehend aus vier konzentrisch angeordneten Kupferringen, durch ein Ätzverfahren generiert. Die Ringe liegen mit einem Abstand von 3 mm zueinander auf der Leiterplattenscheibe, sind über einen Zwischensteg miteinander querverbrückt und weisen eine Breite von 0,75 mm auf. Auf der anderen Seite verblieb die unstrukturierte Kupferschicht als Gegenelektrode. In Abbildung 4 ist die schematische und geometrische Anordnung des Elektrodensystems illustriert sowie die Epoxidharz-DBE im Plasma-OFF und Plasma-ON Modus dargestellt.

Vor Inbetriebnahme wurde die untere, strukturierte Elektrode zum Schutz gegen Plasma-induzierte Erosionsprozesse mit einem manuell aufzutragenden Plastik 70®-Lack (CRC Industries GmbH) überzogen. Die so beschichtete Elektrode hatte eine zeitlich limitierte Betriebsdauer von ca. 45 Minuten. Danach musste die Schutzschicht mittels Aceton (99.5 %, Carl Roth GmbH + Co. KG) abgelöst und erneuert werden. Der oben erwähnte Einbau des Elektrodensystems in einen Deckel, der exakt auf die untere Schale einer Petrischale (Ø 55 mm) aufsetzen kann,

ermöglicht die gleichmäßige und flächige Behandlung von in der Petrischale befindlichen Flüssigkeiten (s. Abbildung 4). Hierbei wird der Abstand des flüssigen Mediums zur Elektroden-

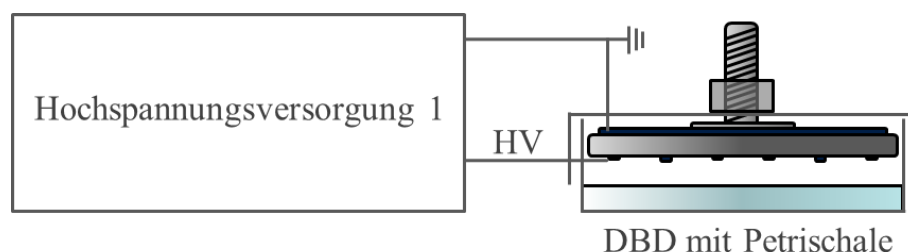


**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Elektrodensystems (links), Epoxidharz-basierte Elektrode im Plasma-OFF-Modus (Mitte), Epoxidharz-basierte Elektrode im Plasma-ON-Modus (rechts).

oberfläche durch das verwendete Volumen definiert. Bei allen durchgeführten Versuchen wurde der Abstand zwischen Elektrode und Flüssigkeitsoberfläche durch die einheitliche Verwendung von 5 ml Probevolumen konstant bei 5 mm gehalten.

#### *b. Elektrische Ansteuerungsparameter*

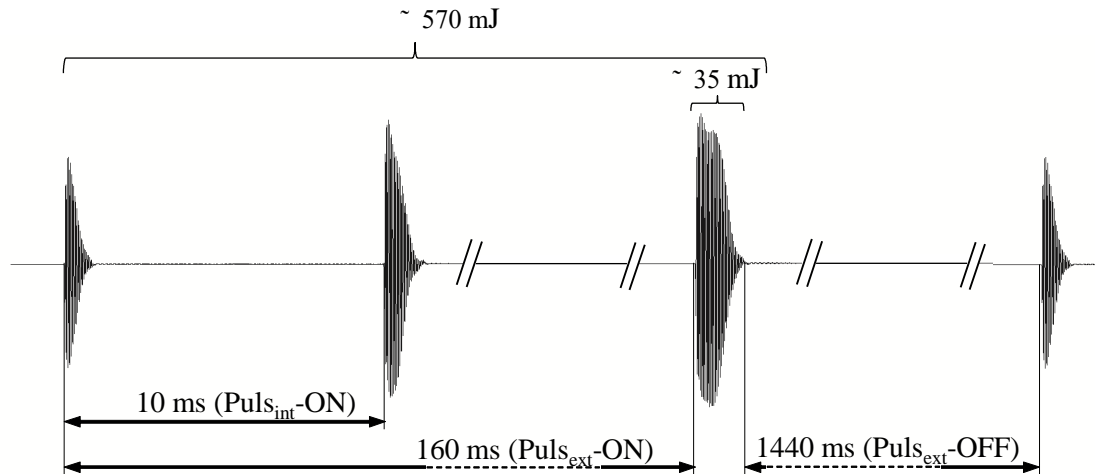
Die Speisung der DBE erfolgte über eine hochfrequente Hochspannung (20 kHz, 20 kV<sub>p-p</sub>), die mit einer ON-OFF-Impulsfolge getaktet wurde. Zur Verminderung der freigesetzten Plasmaenergie wurde der ON-Puls nochmals durch eine interne Impulsfolge getaktet. Die elektrische Ansteuerung wurde mit dem in Abbildung 5 schematisch dargestellten Aufbau realisiert. Die eingespeiste Leistung wurde mittels Spannungsabfall über den Kapazitäten und der Spannung einer HV-Sonde bestimmt. Das dazugehörige Pulsmuster ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Der ON-Puls hatte eine gemessenen ON-Zeit von ca. 160 ms bei einer OFF-Zeit von ca. 1440 ms, während der interne Puls eine ON-Zeit von ca. 1 ms und einer Plasma- OFF Zeit von ca. 9 ms aufgewiesen hat.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der elektronischen Ansteuerung der *Epoxidharz*-basierten DBE 1.

Wie in Abbildung 6 ersichtlich ist, ist die erzeugte Folge von Plasmapulsen sehr instabil. Pro Puls wurden ca. 35 mJ in das Plasma eingekoppelt. Dies wiederum entspricht 570 mJ pro

Pulspaket. Angesichts des instabilen zeitlichen Verlaufes und der inhomogenen Pulsformen wurde ein neues elektronisches Ansteuerungssystem konstruiert, welches den in der Literatur vorgegebenen elektrischen Parametern nachempfunden wurde<sup>(27-29, 54, 69)</sup>.



**Abbildung 6:** Darstellung des komplexen Pulsmusters der *Epoxidharz*-basierten DBE 1. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Pulse und der experimentell ermittelten Pulsformen. Hierbei steht  $Puls_{int}$  für interner Puls und  $Puls_{ext}$  für externer Puls. ON bezeichnet den Plasma-ON-Zustand, während OFF für den gegensätzlichen Plasma-OFF Zustand steht.

#### 4.1.2 *Epoxidharz*-DBE 2

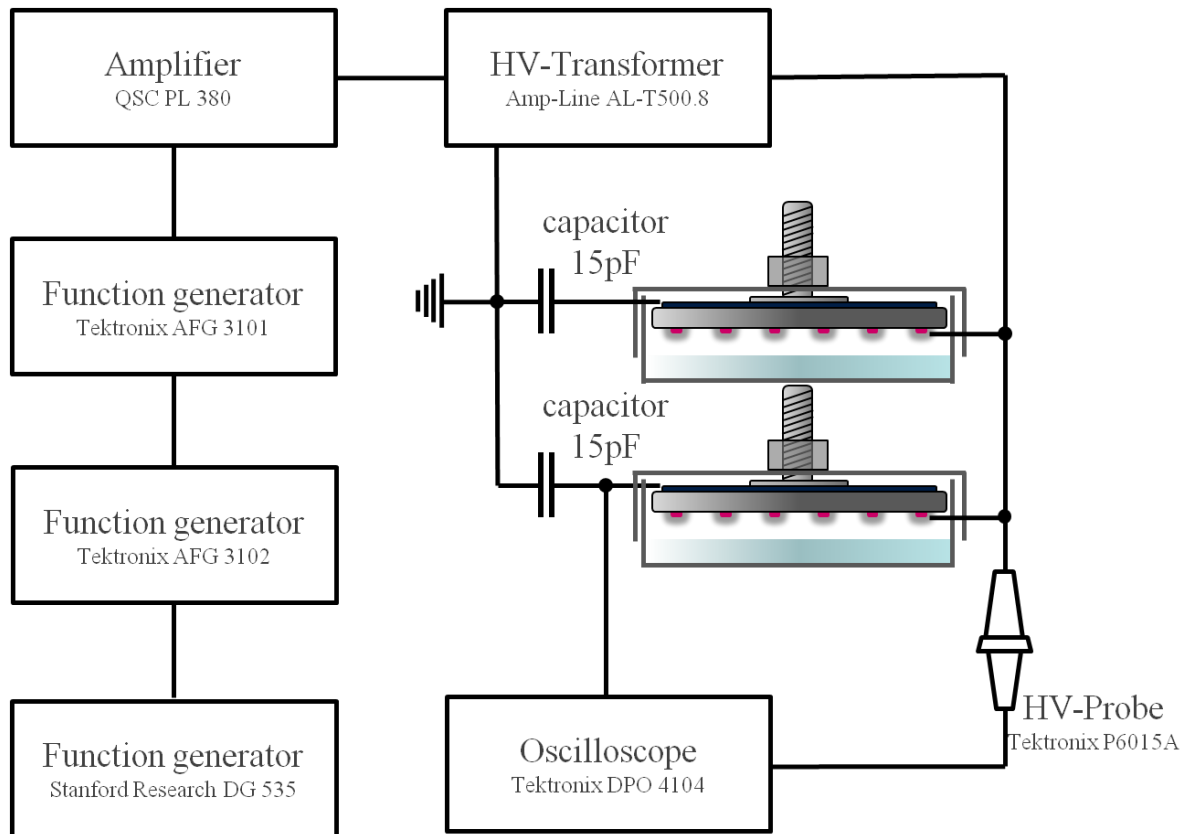
##### a. Geometrischer Aufbau des Elektrodensystems

In Abbildung 7 ist das neu konzipierte und konstruierte elektronische Ansteuerungssystem für die oben beschriebene *Epoxidharz*-DBE dargestellt. Der Aufbau des Elektrodensystems entspricht dem in 2.1.1 beschriebenen Aufbau der *Epoxidharz*-DBE 1.

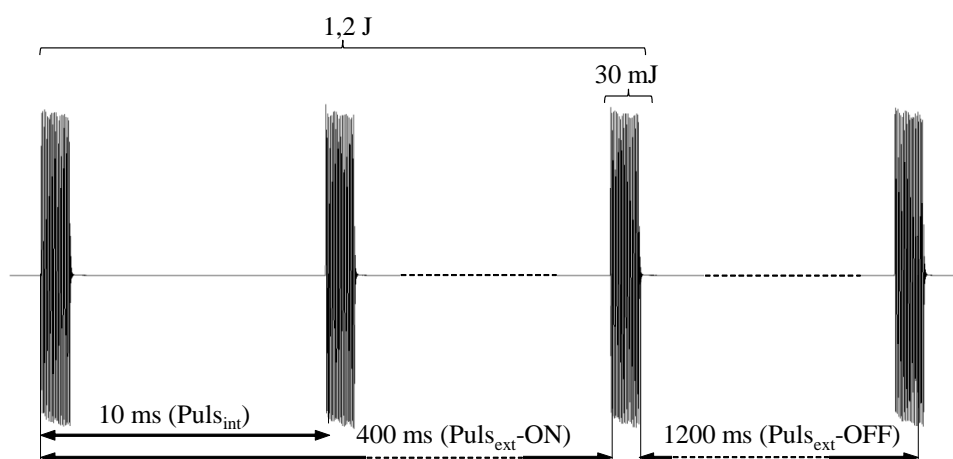
##### b. Elektrische Ansteuerungsparameter

Mit der illustrierten Ansteuerung konnten zwei parallel angeschlossene DBE mit einer gepulsten sinusförmigen Hochspannung einer Amplitude von  $20\text{ kV}_{pp}$  bei einer Frequenz von  $20\text{ kHz}$  betrieben werden. Hierbei wurden die zwei DBE durch eine getaktete hochfrequente Hochspannungsquelle gespeist. Die eingespeiste Leistung wurde mittels Spannungsabfall über den Kapazitäten und der Spannung einer HV-Sonde bestimmt. Das der Literatur nachempfundene Pulsmuster<sup>(69)</sup>, welches aus einem externen und internen Puls besteht, ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Der ON-Puls hatte eine ON-Zeit von  $400\text{ ms}$  und eine OFF-Zeit von  $1200\text{ ms}$ . Auch hier wurde der ON-Puls nochmals getaktet und so hat der interne Puls eine ON-Zeit von  $1\text{ ms}$  und einer Plasma-OFF Zeit von  $9\text{ ms}$  aufgewiesen. Wie in Abbildung 8

ersichtlich ist, ist die erzeugte Folge von Plasmapulsen stabil. Pro Puls wurden ca. 30 mJ in das Plasma eingekoppelt. Dies wiederum entspricht 1,2 J pro Pulspaket. Damit wurde im Vergleich zur DBE 1 die ca. zweifache Leistung pro Pulspaket von der DBE 2 erbracht.



**Abbildung 7:** Darstellung der elektronischen Laboransteuerung zum Betreiben von zwei parallel angeschlossenen *Epoxidharz*-basierten DBE 2.



**Abbildung 8:** Darstellung des komplexen Pulsmusters der *Epoxidharz*-basierten DBE 2, welches mit einer neu zusammengestellten Laboransteuerung generiert wird. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Pulse und die experimentell ermittelten Pulsformen. Puls<sub>int</sub> steht hierbei für den internen Puls, während Puls<sub>ext</sub> für den externen Puls steht. ON bezeichnet den Plasma-ON-Zustand und OFF den gegensätzlichen Plasma-OFF-Zustand.



Für Plasmabehandlungen in strömender Argonatmosphäre wurde ein geometrisch identischer DBE-Aufbau genutzt, wie er in Abbildung 9 für die *Keramik*-basierte DBE dargestellt ist. Die Elektrodenanordnung entspricht der Anordnung in Abbildung 4. Sie ist in ein Gehäuse eingebettet, welcher exakt auf die untere Schale einer Petrischale (Ø 55 mm) aufsetzen kann. Im Deckel befinden sich neben einem O-Ring aus Gummi zwei kleine Öffnungen, welche als Gasein- und Gasauslass fungieren. Unter Verwendung entsprechender Gase und eines Gas-Flow-Kontrollers (MKS Mass-flow®, Typ 647, MKS instruments, inc.) können somit die Arbeitsbedingungen für die DBE je nach Bedarf genau definiert und variiert werden. Mit Hilfe des Gasein- und Gasauslasses kann die DBE nicht nur unter Verwendung von atmosphärischer Luft untersucht werden. Diese Vorrichtung ermöglicht die exklusive Anwendung von unterschiedlichen Gasen wie z.B. Argon, Sauerstoff, Stickstoff oder genau definierten Gasgemischen. Nicht nur die Art des Arbeitsgases kann hierbei variiert werden, durch die Verwendung eines Gas-Flow-Kontrollers kann auch die Gasflussrate unterschiedlich stark eingestellt und untersucht werden. Der Gasfluss betrug in Argon durchgeführten Versuchen mit dieser Anordnung 0,5 Standardliter pro Minute und die Vorspülzeit 5 min, d. h. mit dem Arbeitsgas wurde das System 5 min lang ohne Plasmazündung (vor)gespült, um die Umgebungsluft aus diesem zu verdrängen. Das Plasma wurde in Argon-Atmosphäre durch eine Spannung von 3 kV<sub>peak</sub> erzeugt, die Frequenz betrug jeweils 40 kHz und die Plasma-on-off-Zeit war identisch mit der in Luft.

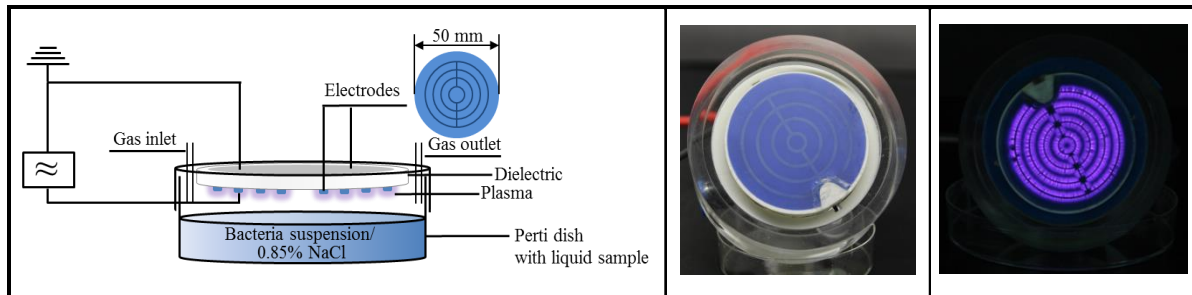
### 4.1.3 *Keramik*-basierte DBE

#### *a. Geometrischer Aufbau des Elektrodensystems*

Das kreisrunde Elektrodensystem ist ähnlich wie bei der *Epoxidharz*-DBE in einem Deckel eingebettet, welcher exakt auf die untere Schale einer Petrischale (Ø 55 mm) aufsetzen kann (s. Abbildung 9). Im Deckel befinden sich neben einem O-Ring aus Gummi zwei kleine Öffnungen, welche als Gasein- und Gasauslass fungieren. Unter Verwendung entsprechender Gase und eines Gas-Flow-Kontrollers (MKS Mass-flow®, Typ 647, MKS instruments, inc.) können somit die Arbeitsbedingungen für die *Keramik*-basierte DBE je nach Bedarf genau definiert und variiert werden. Mit Hilfe des Gasein- und Gasauslasses kann die DBE nicht nur unter Verwendung von atmosphärischer Luft untersucht werden. Diese Vorrichtung ermöglicht die exklusive Anwendung von unterschiedlichen Gasen wie z.B. Argon, Sauerstoff, Stickstoff oder genau definierten Gasgemischen. Nicht nur die Art des Arbeitsgases kann hierbei variiert

werden. Durch die Verwendung eines Gas-Flow-Kontrollers kann auch die Gasflussrate unterschiedlich stark eingestellt und untersucht werden.

Neben dem Gasein- und Gasauslass befinden sich zudem im Deckel elektrische Zuleitungen für die Elektroden der DBE.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Elektrodensystems (links), *Keramik-basierte Elektrode im Plasma-OFF Modus* (Mitte), *Keramik-basierte Elektrode im Plasma-ON Modus* (rechts).

Auf der Unterseite einer 1,5 mm dicken, industriell gefertigten Keramikscheibe ( $\varnothing$  50 mm) ist die Hochspannungselektrode (HV-Elektrode) aufgebracht. Die HV-Elektrode setzt sich aus vier, 35  $\mu$ m dicken, konzentrisch angeordneten Ringen, mit verschiedenen Durchmessern, zusammen. Die Ringe der HV-Elektrode haben eine Breite von 0,75 mm. Sie sind mit einem Abstand von 3 mm zueinander auf der Keramikscheibe fixiert und über einen Mittelsteg elektrisch miteinander querverbrückt. Die hier beschriebene Elektrodengeometrie ist quasi identisch zur bereits oben genannten Geometrie der *Epoxidharz-DBE*. Anders als bei der *Epoxidharz-DBE* besteht das Material, aus der die Elektrode hergestellt wurde, aus einer kommerziell erhältlichen Silber/Platin-Konduktorpaste und nicht aus Kupfer. Zum Schutz gegen Plasma-induzierte Erosionsprozesse ist die HV-Elektrode mit einer permanenten Glaskeramikschicht überzogen. Die nicht strukturierte, flächige und kreisrunde Gegenelektrode befindet sich auf der Oberseite der Keramikscheibe und besteht ebenfalls aus der kommerziell erhältlichen Silber/Platin Konduktorpaste. Sie weist eine Schichtdicke von 35  $\mu$ m auf. Die Keramikscheibe zwischen Hochspannungs- und Gegenelektrode fungiert in dieser Elektrodenanordnung als Dielektrikum.

### *b. Elektrische Ansteuerungsparameter*

Zum Betreiben der keramikbasierten Oberflächen-DBE wurde eine sinusförmige Spannung mit einer Frequenz von 6 kHz angelegt. Das Signal eines Funktionsgenerators (Agilent 33120A) wurde verstärkt und in eine Hochspannung von 17 kV<sub>(p-p)</sub> transformiert. In Abbildung 10 ist die

schematische Anordnung der elektrischen Ansteuerung in ihren einzelnen Funktionseinheiten abgebildet.

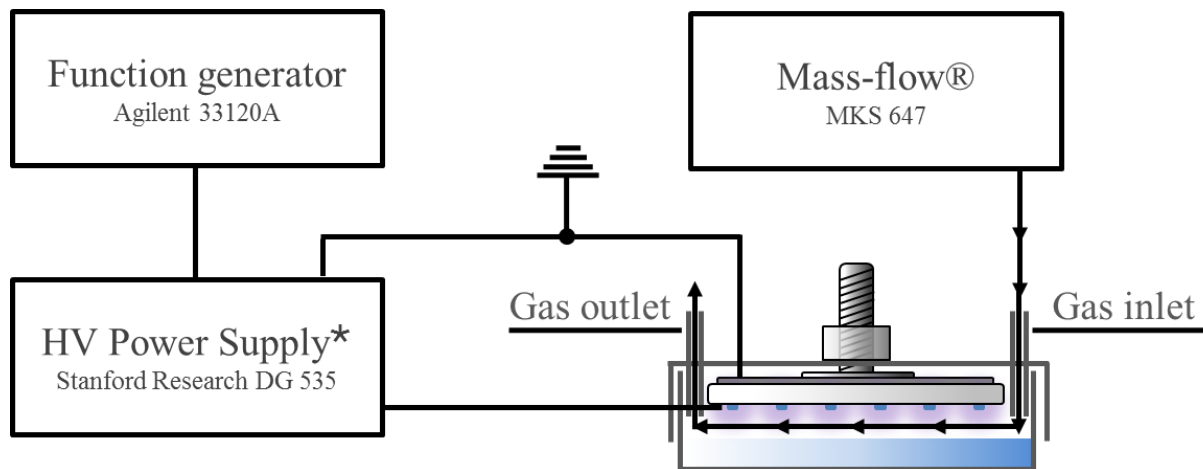


Abbildung 10: Schematische Darstellung der elektronischen Ansteuerung zum Betreiben der *Keramik-DBE*.

Um wiederum die Betriebstemperatur der Gasentladung auf einem niedrigen, für die lebenden Zellen kompatiblen Level zu halten, wurde ein Pulsmuster mit 100 ms Plasma-ON und 900 ms Plasma-OFF verwendet, welches in Abbildung 11 schematisch dargestellt ist. Eine interne Takung des Plasma-ON-Pulses wie bei der *Epoxidharz-DBE* gibt es hier jedoch nicht. Aus diesem Pulsmuster resultierte eine durchschnittliche eingespeiste Energie von 1 J pro Zyklus mit einer durchschnittlichen Leistung von 1,4 W. Die Leistung während der einzeln betrachteten Plasma ON-Phase betrug dabei 14 W. Damit wurde im Vergleich zur DBE 2 (1,2 J in 1,6 s) innerhalb von 1 s annähernd die gleiche Energie pro Pulspaket von der *Keramik-DBE* erzeugt.

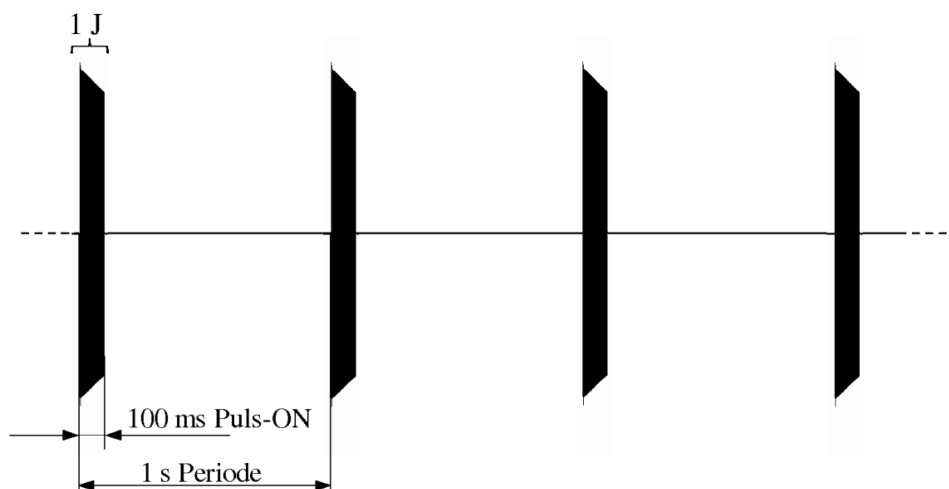
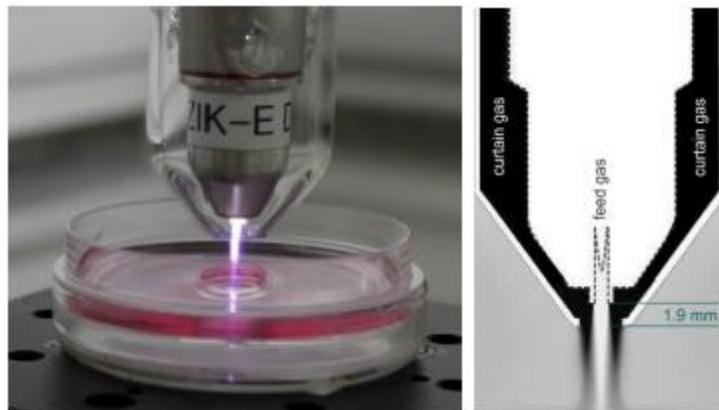


Abbildung 11: Darstellung des Pulsmusters der *Keramik-basierten DBE*. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Pulse und die experimentell ermittelten Pulsformen. ON bezeichnet den Plasma-ON Zustand und beträgt 100 ms. Da die zeitliche Länge eines/einer Pulspaketes/Periode 1 s beträgt, entspricht die Dauer des Plasma-OFF Zustandes 900 ms.

Für Plasmabehandlungen in strömender Argonatmosphäre betrug der Gasfluss mit der in Abbildung 11 dargestellten Anordnung 0,5 Standardliter pro Minute und die Vorspülzeit 5 min, d. h. mit dem Arbeitsgas wurde das System 5 min lang ohne Plasmazündung (vor)gespült, um die Umgebungsluft aus diesem zu verdrängen. Das Plasma wurde in Argon-Atmosphäre durch eine Spannung von 6,9 kV<sub>(p-p)</sub> erzeugt, die Frequenz betrug jeweils 6 kHz und die Plasma-on-off-Zeit war identisch mit der in Luft.

### 4.1.4 Atmosphärendruckplasmajet (kINPen09)

Für spezielle Untersuchungen zum Einfluss der Umgebungsbedingungen auf die antimikrobiellen Plasmaeffekte wurde in dieser Arbeit zusätzlich mit dem bei Atmosphärendruck laufenden kINPen09 (neoplas GmbH, Greifswald, Deutschland) gearbeitet<sup>(70)</sup>. Der kINPen09 ist in Abbildung 12 abgebildet und besteht aus einer geerdeten Ringelektrode sowie einer zentrierten Hochspannungsstabelektrode innerhalb einer Keramikkapillare. Der Plasmajet wurde in den durchgeführten Versuchen mit einer Frequenz von 1,1 MHz betrieben. Als Arbeitsgas wurde Argon mit einer Reinheit von 99,999 % und einer Gasflussrate von 3 Standardlitern pro Minute (slm) verwendet. Der Abstand zwischen Austrittsöffnung des Plasmajets und Probenoberfläche betrug 12 mm, wobei die Länge des Effluenten konstant zwischen 10-12 mm lag.



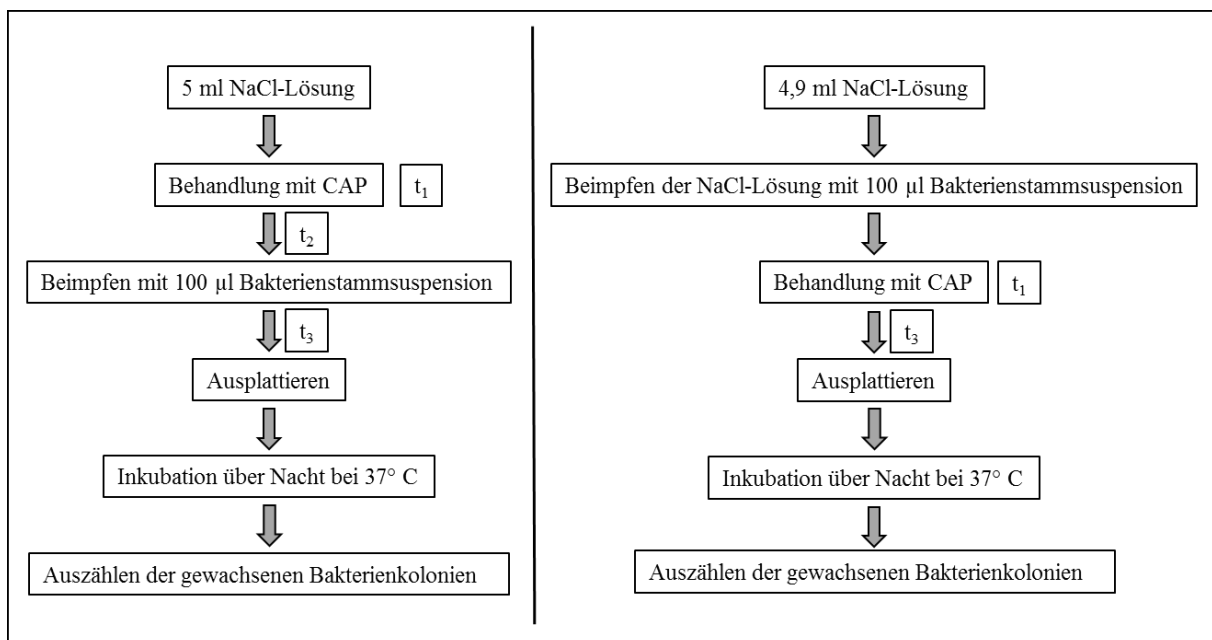
**Abbildung 12:** Behandlung von 5 ml Flüssigkeit durch den kINPen09 mit Gasschutzmantel (links) und die schematische Darstellung des kINPen09 mit Gasschutzmantel (rechts, angepasste Darstellung aus Ref. (35) © [2012] IEEE)

Um den Einfluss des plasmaumgebenen Gases auf die biologische Antwort zu untersuchen, sind kontrollierbare Bedingungen notwendig. Dies wird durch einen von außen aufgebrachten Glasmantel realisiert. Über diesen kann ein Mantelgas appliziert werden, das den Effluenten umschließt und vor unerwünschten Einflüssen aus der natürlichen Umgebung abschirmt<sup>(35, 71)</sup>. Der Abstand zwischen der Öffnung des kINPen09 und der Öffnung des Glasmantels betrug 1,9 mm.

Für den Schutzgasmantel wurden synthetische Luft, Stickstoff, Sauerstoff sowie Mischungen aus Stickstoff und Sauerstoff als Gase verwendet. Bei allen verwendeten Gasen betrug die Gasflussrate des Mantels 5 slm.

## 4.2 Experimentelles Setup zur Plasmabehandlung von Flüssigkeiten und MO-Suspensionen

Für die jeweilige Plasmabehandlung von Flüssigkeiten oder MO-Suspensionen wurden von den entsprechenden Prüfmedien immer 5 ml in die untere Hälfte einer handelsüblichen Einmalpetrischale (Durchmesser = 55 mm) pipettiert. Im Fall einer DBE-Behandlung wurde das Prüfggefäß im Anschluss mit dem in einen Deckel eingebetteten Elektrodensystem verschlossen (s. Abbildung 4 und Abbildung 9) und für eine Dauer von  $t_1$  [min] mit Plasma behandelt.  $t_1$  entspricht der Plasmabehandlungsdauer und stellt eine von drei variablen zeitlichen Parametern in dieser Arbeit dar. Da für alle Versuche immer 5 ml als Probenvolumen gewählt wurde, wurde hier der Abstand zwischen Flüssigkeits- und Elektrodenoberfläche konstant bei 5 mm gehalten. Im Fall einer kINPen09-Behandlung wurden die 5 ml Proben, anders als bei den DBEs, nicht stationär großflächig behandelt, sondern mäanderförmig, mit einem Abstand von 12 mm zur Flüssigkeitsoberfläche, für die Dauer von  $t_1$  [min] mit dem Effluenten abgerastert.



**Abbildung 13:** Ablauf der mikrobiologischen Untersuchungen mit plasmabehandelter NaCl-Lösung (links; indirekte Plasmabehandlung) bzw. mit plasmabehandelten Bakteriensuspensionen (rechts, direkte Plasmabehandlung) mit  $t_1$  (Plasmabehandlungszeit),  $t_2$  (Zeitpunkt der Beimpfung nach Plasmabehandlung) und  $t_3$  (Einwirkzeit bzw. Kontaktzeit) als zeitlich variable Parameter.

Die beiden Schemata in Abbildung 13 geben den Ablauf der mikrobiologischen Untersuchungen mit plasmabehandelter NaCl-Lösung (links; indirekte Plasmabehandlung) bzw. mit

plasmabehandelten Bakteriensuspensionen (rechts; direkte Plasmabehandlung) bildlich wieder. Die Dauer der Plasmabehandlung wurde als  $t_1$  definiert, während der zeitliche Abstand zwischen dem Ende der Plasmabehandlung und dem Beginn der Behandlung der Bakterienstammsuspension mit plasmabehandelter NaCl-Lösung als  $t_2$  bezeichnet wurde. Der Zeitraum, in dem die plasmabehandelte NaCl-Lösung auf die Bakterien einwirkte bzw. die Zeitspanne nach Plasmabehandlung der Bakteriensuspension bis zur Beimpfung der Agarplatten wurde als  $t_3$  beschrieben. Die  $t_1$ -,  $t_2$ - und  $t_3$ -Zeiten sind zeitlich variable Parameter, welche den jeweils durchgeführten Untersuchungsreihen in Abschnitt 4.5.2 "Mikrobiologische Methoden" entnommen werden können.

### 4.3 Plasmadiagnostik

#### 4.3.1 Optische Emissionsspektroskopie (OES)

Optische emissionsspektroskopische Aufnahmen wurden in der vorliegenden Arbeit nur für die DBEs durchgeführt, da diese Untersuchungen für den kINPen09 in der Literatur hinreichend beschrieben sind<sup>(45, 70-72)</sup>.

Die OES wurde zur Charakterisierung der im Plasma angeregten Spezies angewandt. Das Messprinzip ist in Abbildung 14 schematisch illustriert. Hierbei werden die von der Plasmaquelle emittierten Photonen durch eine Kollimationsoptik gebündelt, über einen Kollimationsspiegel geleitet und auf einen Gitterspektrographen reflektiert. Durch den beschriebenen Prozess wird das gebündelte Licht, entsprechend der einzelnen Wellenlängen, in seine spektralen Bestandteile aufgelöst. Mit Hilfe eines Fokussierungsspiegels werden die einzelnen Signale verstärkt und auf einem Detektor abgebildet. Die Detektion der Emission erfolgte mittig, in einem Abstand von 5 mm zur Elektrodenoberfläche. Hierzu wurde eine kreisförmige Öffnung ( $d = 22$  mm) in eine Petrischale ( $d = 55$  mm) geschnitten und mit einer UV/VIS-transmittierenden Quarzglasplatte ( $d = 1$  mm) versiegelt. Dieses Vorgehen ermöglichte eine Messung unter anwendungsnahen Bedingungen. Hinter der Quarzscheibe wurde das Lichtleitkabel samt Kollimationsoptik, bestehend aus einem Cosinus-Korrektor und einer Sammellinse, arretiert. Am anderen Ende des Lichtleitkabels befand sich ein Minispektrometer (AvaSpec 3648,  $\lambda = 200\text{-}1000$  nm,  $n = 300$  g/mm;  $10\text{ }\mu\text{m}$  Spalt). Mit dessen Hilfe wurde die spektral aufgelöste Intensitätsverteilung der Plasmastrahlung aufgenommen. Die OES ermöglicht die erste grundlegende Identifikation der plasmarelevanten reaktiven Spezies. Zudem ist es gleichzeitig eine gute Basismethode, um verschiedene Plasmaquellen zu vergleichen.

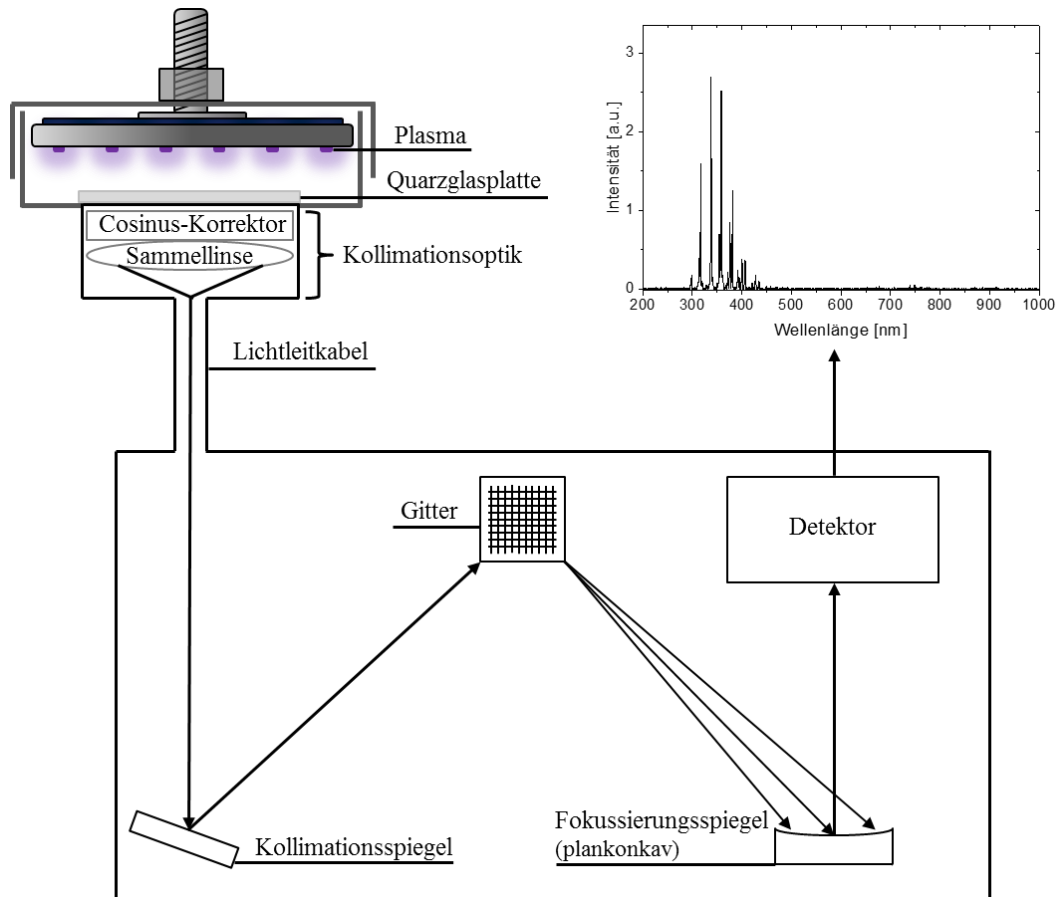


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Anwendungs- bzw. Messprinzips für die OES Messungen an den DBE.

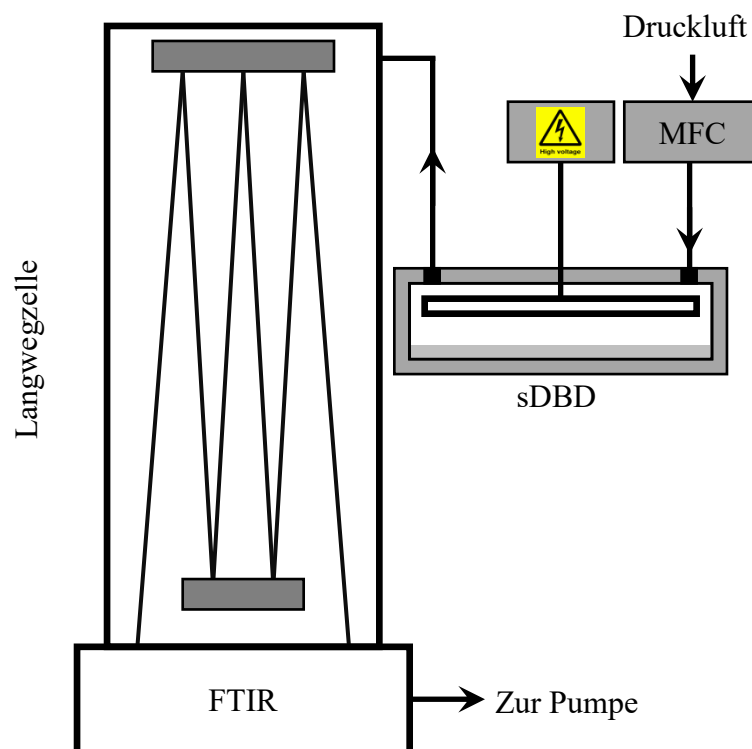
#### 4.3.2 Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR)

Während die zuvor beschriebene OES zur Charakterisierung der angeregten Spezies im Plasma angewendet wurde, diente die FTIR-Absorptionsspektroskopie in der vorliegenden Arbeit zur Detektion von nicht angeregten Molekülen, die durch das Plasma im Spalt zwischen Elektroden- und Flüssigkeitsoberfläche generiert wurden. Dies können zum Beispiel reaktive Stickoxide ( $\text{NO}_x$ ) sowie Sauerstoffspezies ( $\text{O}_y$ ) sein. Diese Moleküle weisen ein induzierbares Dipolmoment auf und absorbieren elektromagnetische Strahlung im infraroten Spektralbereich. Die Quantifizierung dieser Spezies wurde mittels FTIR-Absorptionsspektroskopie durchgeführt. Dabei wurde das Vertex 70v FTIR-Spektrometer (Bruker) mit angeschlossener A134G/QV-Langwegzelle (Bruker) verwendet. Die Abbildung 15 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanordnung. Die DBE war hierbei über ein Nadelventil an die Langwegzelle angeschlossen, in der mittels Vakuumpumpe ein Druck von 50 mbar erzeugt wurde. Mit Hilfe der Langwegzelle konnte eine effektive Absorptionslänge des Spektrometers von 3200 cm realisiert werden. Es wurden mit dieser Apparatur zwei unterschiedliche Versuchsansätze verfolgt. Zunächst erfolgte die Analyse des Gasgemisches, nahe des Plasmas, im

trockenen Zustand. Dazu wurde die DBE oberhalb einer leeren und trockenen Petrischale betrieben und die plasmabehandelte Gasphase kontinuierlich in die Langwegzelle abgeleitet (Abgas). Im zweiten Experiment wurde eine Petrischale mit 5 ml NaCl-Lösung gefüllt, das Plasma über der Flüssigkeitsoberfläche generiert und das Abgas in die Langwegzelle geleitet. In beiden Fällen wurden die Daten nach dem folgenden Prinzip generiert:

Zur Bestimmung des Hintergrundsignales wurde die Gaskammer der Oberflächen-DBEs für 120 min ausschließlich mit Druckluft (bei einer Gasflussrate von 0,5 slm bzw. 1 slm) durchspült. Die DBE befand sich hierbei im Plasma-OFF-Zustand. Das Hintergrundsignal wurde mit einer spektralen Auflösung von  $1\text{ cm}^{-1}$  im Spektralbereich von  $700\text{ cm}^{-1}$  bis  $2500\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen. Direkt im Anschluss der Hintergrundmessung wurde das Plasma gezündet und alle 120 s ein neues FTIR-Spektrum aufgezeichnet. Dieses Vorgehen diente dazu, die zunehmenden Konzentrationen der generierten Spezies in der Langwegzelle zu berücksichtigen. Nach einer Dauer von 10 min konnten keine Veränderungen in den Spektren mehr detektiert werden. Die Konzentrationen der beobachteten Spezies blieben konstant.

Die Identifizierung der unterschiedlichen Spezies in der Gasphase erfolgte unter Verwendung der Hitran Database<sup>(73)</sup> in Kombination mit dem Simulations- und Fitprogramm QMACSoft



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Bestimmung von nicht geladenen Spezies in der Gasphase mittels FTIR-Spektroskopie.



HT der Firma neoplas control GmbH. Die Konzentrationen der identifizierten Moleküle wurden durch Anpassung der theoretischen Absorptionssignale an die Messsignale bestimmt.

### 4.3.3 Prüfung auf homogene Plasmaverteilung über die gesamte Elektrodenoberfläche

Ein Qualitätsmerkmal der DBE stellen die homogene Distribution der Plasmaerzeugung und die damit verbundenen Effekte über die gesamte Elektrodenoberfläche dar. Die Überprüfung der gleichmäßigen Flächenverteilung des Plasmas auf der Elektrode erfolgte optisch durch fotografische Dokumentation. Mit der richtigen Auflösung und Belichtungszeit ist die Fotografie eine einfache und sichere optische Methode, um temporäre Leuchterscheinungen zu visualisieren und zu dokumentieren. Daher wurden in einer abgedunkelten Umgebung fotografische Aufnahmen der DBE im Plasma-On Zustand aufgenommen. Diese sind in Abbildung 4 und Abbildung 9 dargestellt.

## 4.4 Flüssigkeitsanalyse: pH, Wasserstoffperoxid, Nitrit, Nitrat

Für die Flüssigkeitsanalytik kamen leicht zugängliche nass-chemische Analysenverfahren, die üblicherweise auch von der internationalen plasmamedizinischen Forschungsgemeinschaft angewendet werden, zum Einsatz<sup>(23, 26-29, 32, 47, 54, 59, 60)</sup>. Erfasst wurden stabile und gut bestimmbare Parameter wie der pH-Wert als allgemeines Charakteristikum der reaktiven Umgebung, Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) als repräsentative Marker für die plasmainduzierte RNS-Chemie und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) als Repräsentant für die ROS-Chemie<sup>(23, 26-29, 32, 47, 54, 59, 60)</sup>.

### 4.4.1 Reagenzien und Chemikalien für die Flüssigkeitsanalyse

Für die durchgeführten nass-chemischen Analysenverfahren wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Materialien und Geräte verwendet.

**Tabelle 1: Verwendete Reagenzien und Chemikalien für die nass-chemischen Analysenverfahren**

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
Certi Pur® Nitrat-Standardlösung, 1000 mg/l	Merck KGaA, Darmstadt, D
Certi Pur® Nitrit-Standardlösung, 1000 mg/l	Merck KGaA, Darmstadt, D
Spectroquant® Nitrat-Testkit	Merck KGaA, Darmstadt, D
Spectroquant® Nitrit-Testkit	Merck KGaA, Darmstadt, D

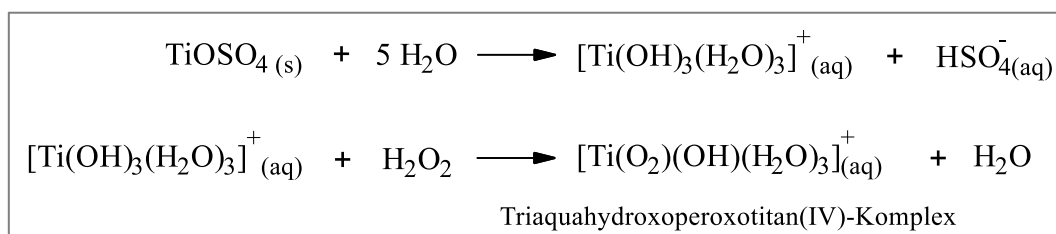
Schwefelsaure Titanylsulfat-Lösung, bestehend aus: - konzentrierter Schwefelsäure (10 %) - Titan(IV)-oxyulfathydrat (0,1 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D Riedel de Haën, Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, D
Wasserstoffperoxidlösung Perdrogen®, 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
60 mM Natriumazid-Lösung, bestehend aus: - hochgereinigtes Wasser - Natriumazid	Milli-Q-Water System Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D

#### 4.4.2 pH Messung

Zur Ermittlung von pH-Änderungen, die durch Plasmabehandlung innerhalb der flüssigen Phase hervorgerufen werden, wurde entweder das Multiparameter-Messsystem InoLab® Multi 9310 IDS (WTW GmbH, Deutschland) in Kombination mit einer SenTik®Mic Halb-Mikromesselektrode (WTW GmbH, Deutschland) oder ein Microprocessor pH Meter 196 (WTW GmbH, Deutschland) zusammen mit einer SenTix® 81 pH Elektrode (WTW GmbH, Deutschland) verwendet.

#### 4.4.3 Bestimmung des Gehaltes an Wasserstoffperoxid in Wasser und NaCl-Lösung

Die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den beiden Prüfmedien Wasser und NaCl-Lösung durch Plasmabehandlung wurde durch Umsetzung mit schwefelsaurer Titanylsulfat-Lösung nachgewiesen<sup>(26, 28)</sup>. In Abbildung 16 sind die ablaufenden Reaktionen in den entsprechenden Gleichungen dargestellt.



**Abbildung 16: Ablaufende chemisch Reaktionen und entsprechende Reaktionsprodukte des Wasserstoffperoxidnachweises mit schwefelsaurer Titanylsulfat-Lösung.**

Bei der Umsetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit schwefelsaurer Titanylsulfat-Lösung entsteht ein gelbgefärbter, lichtdurchlässiger Komplex, welcher photometrisch vermessen und quantifiziert werden

kann. Hierfür wurden 2000 µl plasmabehandelter Probe mit 500 µl 60 mmol/l Natriumazidlösung ( $\text{NaN}_3$ ) versetzt und mit einem Vortexer (Vortex Genie, VWR) vermischt. Die Behandlung der Probe mit  $\text{NaN}_3$  wurde durchgeführt, um den Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch das möglicherweise parallel in der flüssigen Phase angereicherte  $\text{NO}_2^-$  zu verhindern. Nach erfolgter Probenvorbereitung wurde die Probe mit 1000 µl schwefelsaurer Titanylsulfat-Lösung versetzt, vermengt und eine Reaktionsdauer von 10 min bei Raumtemperatur (RT) abgewartet. Der gebildete Peroxotitanium(IV)-Komplex war für 6 Stunden bei RT stabil und wurde in einer 10 mm Küvette ( $V = 1,5\text{-}3\text{ ml}$ , Anwendungsbereich 340-900 nm; VWR, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 407 nm spektralphotometrisch (SPECORD® S600, Analytik Jena AG) vermessen. Die Farbintensität des Komplexes war direkt proportional zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration. Durch Aufzeichnung einer Kalibrationsgeraden (bei  $\lambda = 407\text{ nm}$ ) und unter Einbeziehung des Lambert-Beerschen Gesetzes (mathematische Gleichung I) wurde der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  ermittelt.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (\text{I})$$

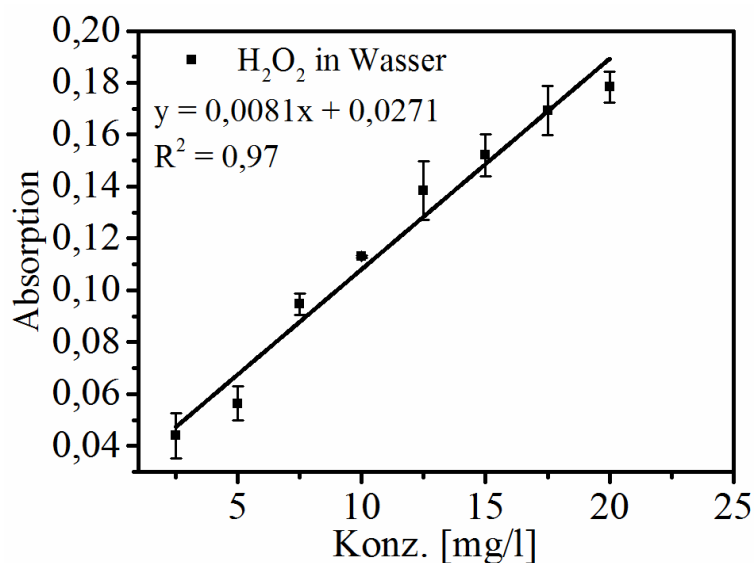
$A$  = Absorption

$\varepsilon$  = molarer Absorptionskoeffizient [ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$c$  = Konzentration [ $\text{mol l}^{-1}$ ]

$b$  = Schichtdicke [cm]

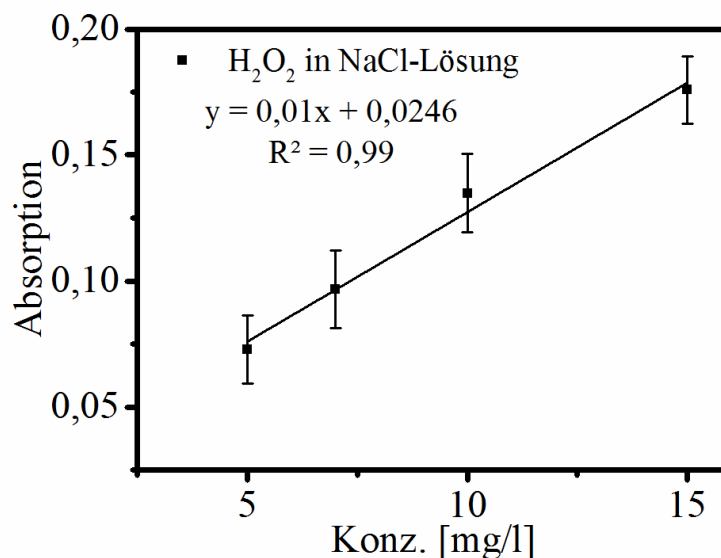
Für die Kalibrationsgerade in Wasser wurden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 und 20 mg/l in hochgereinigtem Wasser hergestellt und entsprechend des angeführten Protokolls verarbeitet.



**Abbildung 17: Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Wasserstoffperoxidnachweises mit schwefelsaurer Titanylsulfat-Lösung in Wasser. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ .**

In Abbildung 17 sind die Messwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Kalibration in Wasser dargestellt. Die Absorptionen der einzelnen Kalibrierstandards wurden in Abhängigkeit von der Konzentration linear aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt. Daraus ergab sich die Geradengleichung  $y = 0,0081x + 0,0271$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,97$ .

Für die Kalibrationsgerade in NaCl-Lösung wurden Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 5, 7, 10 und 15 mg/l in NaCl-Lösung hergestellt und entsprechend des angeführten Protokolls verarbeitet. In Abbildung 18 sind die Messwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Kalibration in Wasser dargestellt. Die Absorptionen der einzelnen Kalibrierstandards wurden in Abhängigkeit von der Konzentration linear aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt. Daraus ergab sich die Geradengleichung  $y = 0,01x + 0,0246$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,99$ .



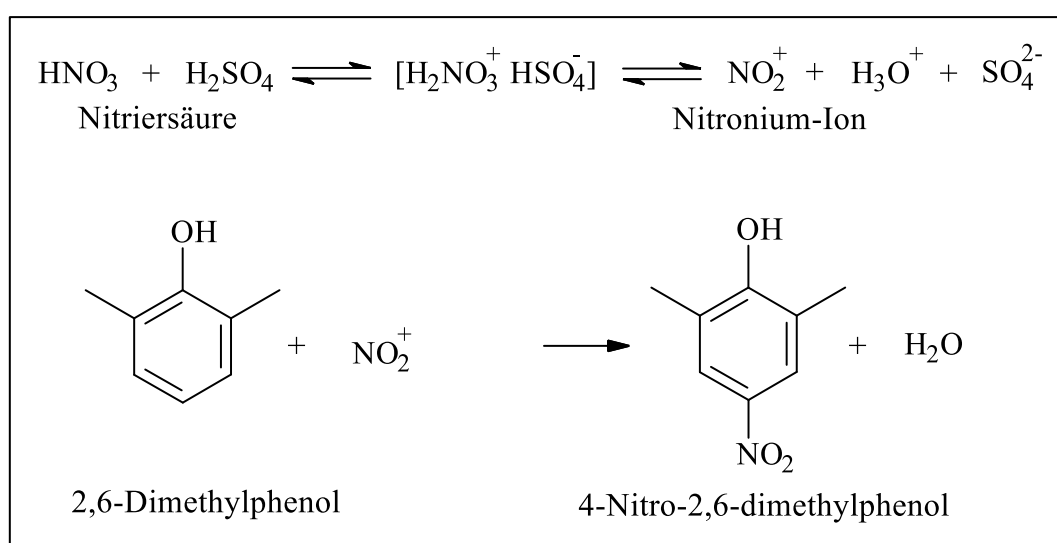
**Abbildung 18:** Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Wasserstoffperoxids nachweis mit schwefelsaurer Titansulfat-Lösung in NaCl-Lösung. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ .

#### 4.4.4 Bestimmung des Nitratgehaltes

Durch die Wechselwirkungen zwischen Plasma/Gasphase und der benachbarten Flüssigkeitsoberfläche können sich Nitrationen ( $\text{NO}_3^-$ ) innerhalb der wässrigen Phasen anreichern, welche nass-chemisch mittels eines kommerziell erhältlichen Spectroquant®-Nitrat-Tests (# 109713, Merck KGaA, Deutschland) nachgewiesen wurden. Dieses Verfahren ist analog zur DIN 38405-9:2011-09 "Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Anionen (Gruppe D) - Teil 9: Photometrische Bestimmung von Nitrat (D 9)". Der Nachweis beruht darauf, dass  $\text{NO}_3^-$ -Ionen in schwefel- und phosphorsaurer Lösung zu

Nitronium-Ionen reagieren und anschließend mit 2,6-Dimethylphenol, über eine elektrophile Substitution in para-Position, zu 4-Nitro-2,6-dimethylphenol umgesetzt werden. Die entsprechenden chemischen Reaktionsgleichungen sind in Abbildung 19 wiedergegeben.

Die photometrisch gemessene Absorption des Reaktionsproduktes ist direkt proportional zur  $\text{NO}_3^-$ -Konzentration, welche über eine Kalibrationsgerade rechnerisch ermittelt werden kann. Da NaCl-Lösungen mit einer Konzentration  $>0,2\%$  diese Nachweisreaktion in ihrer Empfindlichkeit erheblich beeinträchtigen, wurden die zu vermessenden NaCl-Lösungen ( $0,85\%$ ) im Vergleich zu Wasser unterschiedlich vorbereitet. Die unterschiedlichen Vorgehensweisen werden nachfolgend ausführlich erläutert.



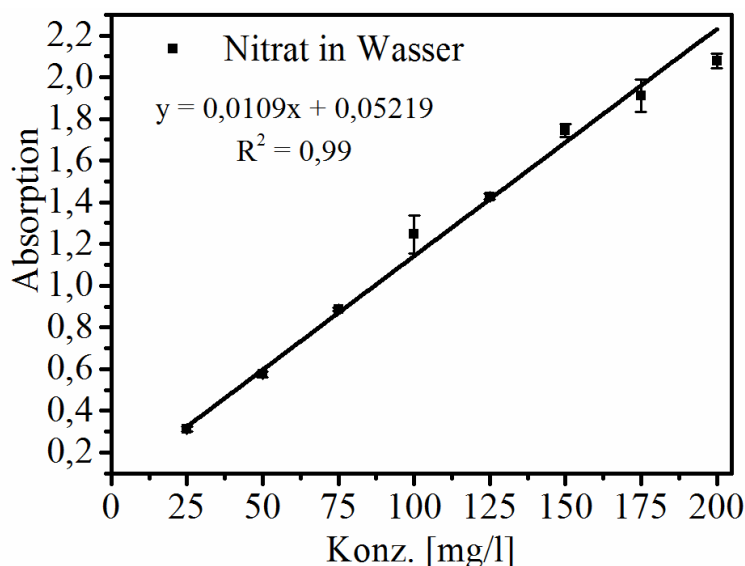
**Abbildung 19:** Ablaufende chemisch Reaktionen und entsprechende Reaktionsprodukte des Spectroquant®-Nitrat-Tests.

#### 4.4.4.1 Bestimmung des Nitratgehaltes in Wasser

Entsprechend der Anwendungsvorschrift wurden 4 ml einer Schwefel-/Phosphorsäuremischung vorgelegt (Nachweisreagenz 1) und mit 500  $\mu\text{l}$  CAP-behandelten Wassers versetzt. Durch die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  des Nachweisreagenz 2 (4-Nitro-2,6-dimethylphenol) und anschließendem Vortexen (Vortex Genie, VWR, Deutschland) wurde die Nachweisreaktion bei Raumtemperatur (RT) gestartet. Die Reaktionszeit des Nachweises betrug 10 min. Anschließend wurden die Proben in Halbmikroküvetten ( $V = 1,5\text{--}3\text{ ml}$ , Anwendungsbereich 340–900 nm; VWR, Deutschland) überführt und bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340\text{ nm}$  spektralphotometrisch (SPECORD® S600, Analytik Jena AG) vermessen.

Für die Kalibrationsgerade in Wasser wurden Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 20, 50, 75, 100, 125, 150, 175 und 200 mg/l in hochgereinigtem Wasser hergestellt und entsprechend des angeführten Protokolls verarbeitet.

In Abbildung 20 sind die Messwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen für die  $\text{NO}_3^-$ -Kalibration in Wasser dargestellt. Die Absorptionen der einzelnen Kalibrierstandards wurden in Abhängigkeit von der Konzentration linear aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt. Daraus ergab sich die Geradengleichung  $y = 0,0109x + 0,05219$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,99$ .



**Abbildung 20:** Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Spectroquant®-Nitrattests in Wasser. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ .

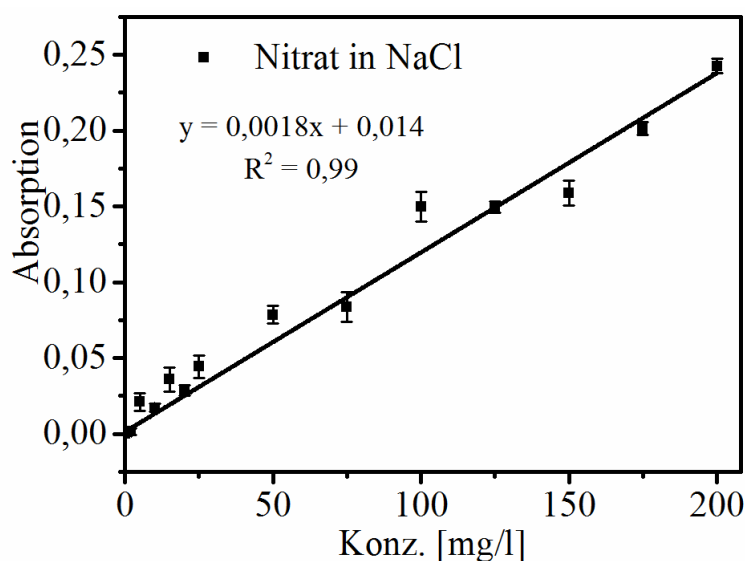
#### 4.4.4.2 Bestimmung des Nitratgehaltes in 0,85 %iger NaCl-Lösung

Aufgrund des hohen NaCl-Gehaltes mussten für die Bestimmung von  $\text{NO}_3^-$  in 0,85%iger NaCl-Lösungen mittels Spectroquant® -Nitrat-Test (# 109713, Merck KGaA, Deutschland) die Proben nach der Plasmabehandlung und vor dem Nachweis wie folgt vorbehandelt werden: Die CAP-behandelten Proben wurden durchmischt und 500  $\mu\text{l}$  Aliquote mit 4500  $\mu\text{l}$  Reinstwasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Dieser Verdünnungsschritt war nötig, da laut Herstellerangaben NaCl in Konzentration  $> 0,2\%$  den Nachweis stören und zu falschen Ergebnissen führen. Die vorbehandelten Proben wurden nach dem gleichen Verfahren wie in Abschnitt 4.4.4.1 beschrieben weiterverarbeitet und bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340\text{ nm}$  spektralphotometrisch (SPECORD® S600, Analytik Jena AG) vermessen.

Für die Kalibrationsgerade wurden Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 und 200 mg/l in NaCl-Lösung (0,85%) hergestellt und entsprechend des hier beschriebenen Protokolls verarbeitet.

Die Absorptionen der einzelnen Kalibrierstandards wurden in Abhängigkeit von der Konzentration linear aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt. Daraus ergab sich die

Geradengleichung  $y = 0,0018x + 0,014$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,99$  (s. Abbildung 21).



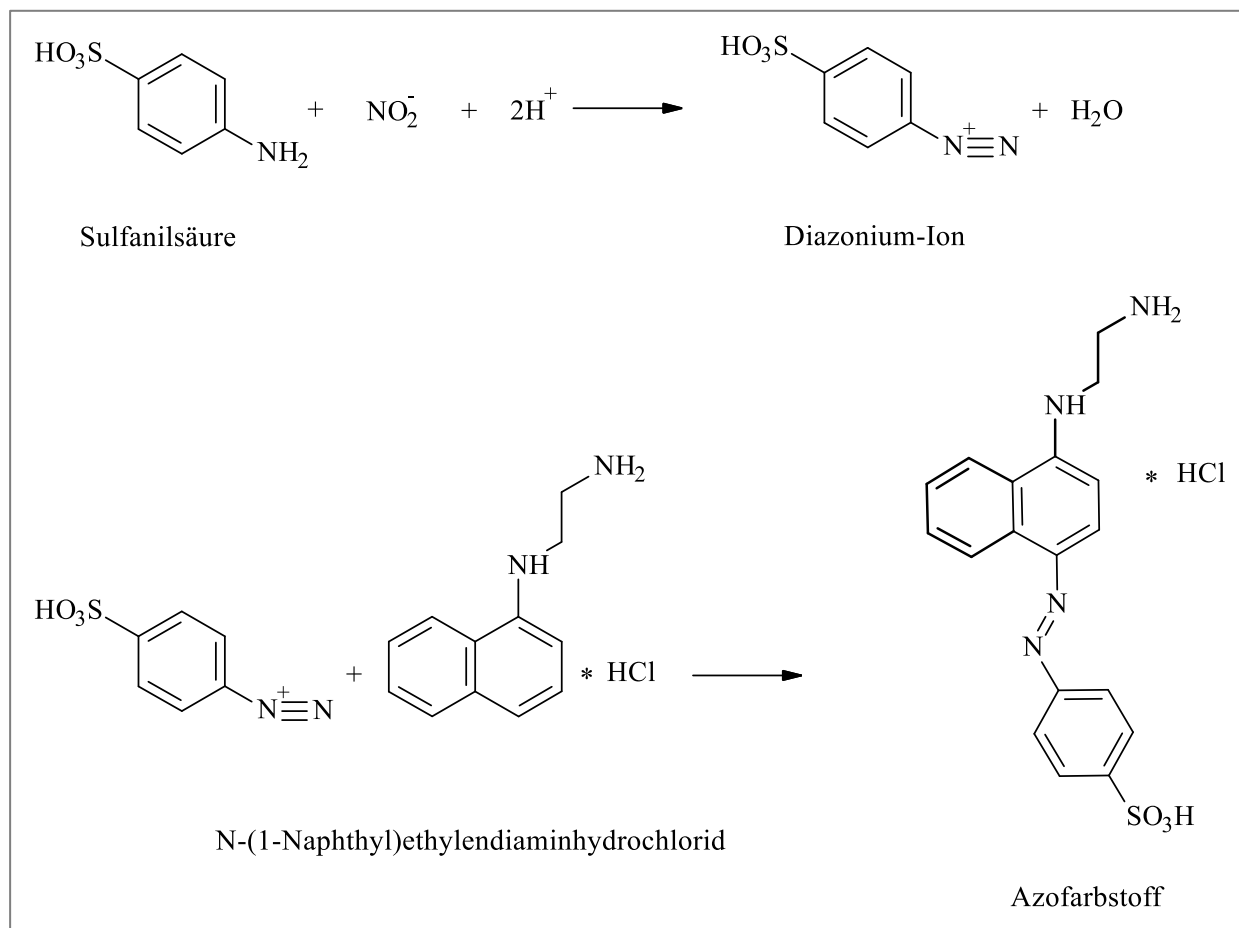
**Abbildung 21:** Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Spectroquant®-Nitrattests in NaCl-Lösung (0,85 %). Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ .

#### 4.4.5 Bestimmung des Nitritgehaltes in Wasser und 0,85 %iger NaCl-Lösung

Als Folge der Interaktion der dielektrisch-behinderten Oberflächenentladungen mit der umgebenden Gasphase und nachfolgend angrenzenden Flüssigkeitsoberfläche reichern sich neben  $\text{NO}_3^-$ -Ionen auch Nitrit-Ionen ( $\text{NO}_2^-$ ) als zweite stabile und nachweisbare stickstoffhaltige Verbindung innerhalb der wässrigen Phase an. Die  $\text{NO}_2^-$ -Ionen wurden nass-chemisch mittels eines kommerziell erhältlichen Analysen-Kits von Spectroquant® der Firma Merck nachgewiesen. Die ablaufenden chemischen Nachweisreaktionen sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Aminogruppe ( $-\text{NH}_2$ ) der Sulfanilsäure reagiert in schwach sauren Lösungen mit  $\text{NO}_2^-$  zu einer Diazoniumgruppe, welche unter den Reaktionsbedingungen mit N-(1-Naphthyl)ethyldiamin in para-Stellung, entsprechend einer elektrophilen Substitutionsreaktion, zu einem Magenta-farbenen Azofarbstoff koppelt.

Aufgrund von hohen  $\text{NO}_2^-$ -Konzentrationen innerhalb der plasmabehandelten Proben musste vor der Bestimmung eine Probenvorbereitung durchgeführt werden, indem die Ursprungslösungen 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt wurden. Entsprechend der Anwendungsvorschrift für Wasseranalysen wurden 5 ml der vorbereiteten Probe vorgelegt, mit einem gestrichenen Maßlöffel des Nachweisreagens versetzt und gevortext, bis sich dieses komplett im Reaktionsmedium löste. Nach einer Reaktionszeit von 10 min bei RT wurde der entstehende Azofarbstoff

bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 525 \text{ nm}$  spektralphotometrisch (SPECORD® S600, Analytik Jena AG) vermessen. Die Farbintensität des Reaktionsproduktes ist direkt proportional zur  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration. Durch Aufzeichnung einer Kalibrationsgeraden (bei  $\lambda = 525 \text{ nm}$ ) und



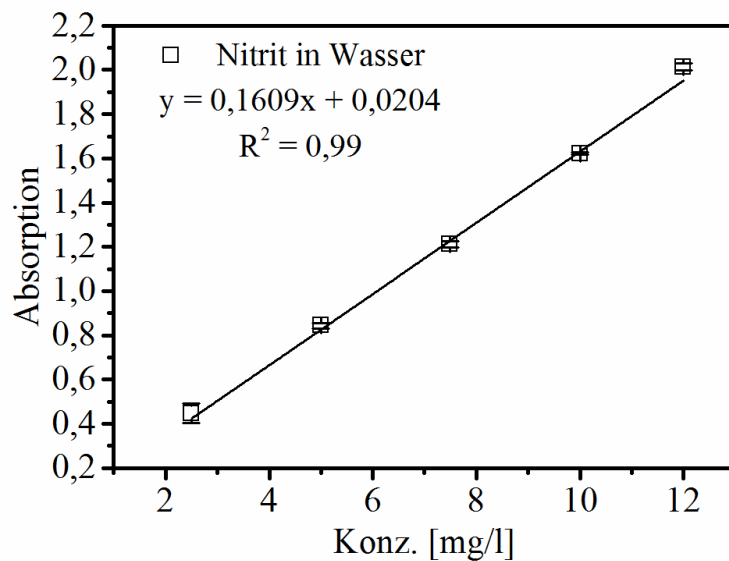
**Abbildung 22:** Ablaufende chemische Reaktionen und entsprechende Reaktionsprodukte des Spektroquant® Nitrit-Tests.

unter Einbeziehung des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung I) wurde der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  ermittelt. Für die Kalibrationsgerade in Wasser wurden Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 und 12,0 mg/l in hochgereinigte Wasser hergestellt und entsprechend des angeführten Protokolls verarbeitet. Die Absorptionen der einzelnen Kalibrierstandards wurden in Abhängigkeit von der Konzentration linear aufgetragen und eine Regressionsanalyse durchgeführt. Daraus ergab sich die Geradengleichung  $y = 0,1609x + 0,0204$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,99$  (s. Abbildung 23).

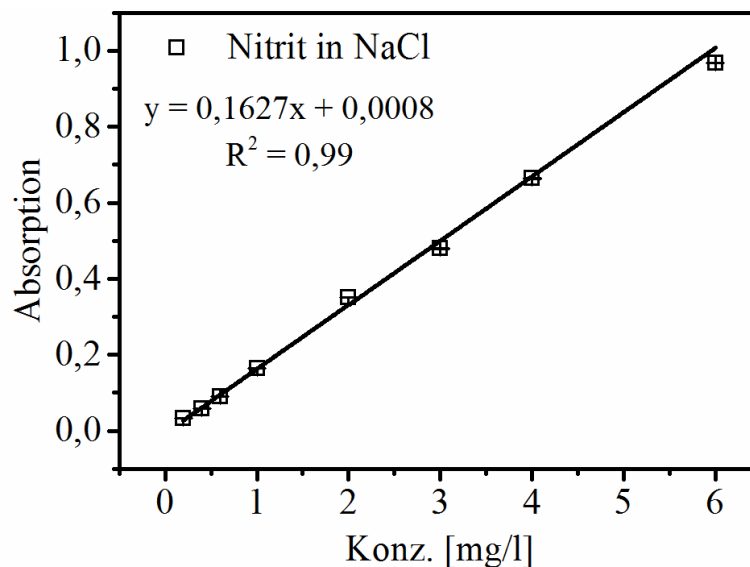
Für die Kalibrationsgerade in NaCl-Lösung wurden Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 0,2; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 und 6,0 mg/l in NaCl-Lösung (0,85%) hergestellt und entsprechend des angeführten Protokolls verarbeitet. Die Absorptionen der einzelnen Kalibrierstandards wurden in Abhängigkeit von der Konzentration linear aufgetragen und eine



Regressionsanalyse durchgeführt. Daraus ergab sich die Geradengleichung  $y = 0,1627x + 0,0008$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,99$  (s. Abbildung 24).



**Abbildung 23:** Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Spectroquant®-Nitrittests in Wasser. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ .



**Abbildung 24:** Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Spectroquant®-Nitrittests in NaCl-Lösung (0,85 %). Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ .

## 4.5 Mikrobiologie

Neben der physikalischen und chemischen Analyse sollten die Plasmaeffekte zudem mit Hilfe von ausgewählten Mikroorganismen an lebenden Zellen untersucht werden. Um hierbei eine gute Einschätzung des Wirkungsspektrums zu ermöglichen, wurden die besagten Plasmaeffekte mit Hilfe von grampositiven als auch gramnegativen Bakterien sowie einer Hefe untersucht.

Hierfür wurden die etablierten und leicht kultivierbaren Testmikroorganismen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* verwendet. Die verwendeten Laborstämme sowie deren Besonderheiten werden im nachfolgenden Abschnitt im Einzelnen beschrieben.

### 4.5.1 Mikroorganismen für die Untersuchung von Plasmaeffekten

#### 4.5.1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

*E. coli* ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes, säurebildendes, fakultativ anaerobes und ubiquitäres Bakterium, das der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet ist<sup>(74-76)</sup>. Eine Rasterelektronenmikroskopaufnahme von *E. coli*-Bakterien ist in Abbildung 25 zu sehen.

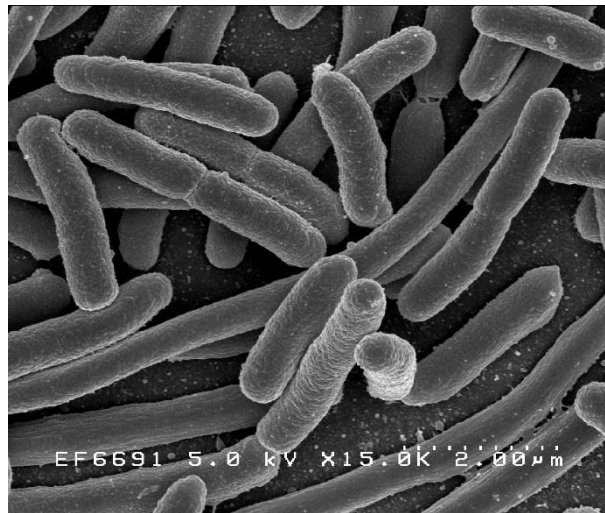


Abbildung 25: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von *Escherichia coli*-Bakterien<sup>(77)</sup>. Quelle: NIH – National Institute of Allergy and Inf Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von *Escherichia coli* Bakterien<sup>(66)</sup>. (Bildquelle: NIH – National Institute of Allergy and Infectious Diseases, [http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/publicmedia/Pages/image\\_library.aspx](http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/publicmedia/Pages/image_library.aspx.ec-tious-Diseases))

*E. coli* besiedelt bevorzugt den menschlichen und tierischen Darm und gilt als typisches Darmbakterium, das für die natürliche Darmflora essentiell ist und diese im Gleichgewicht hält<sup>(76)</sup>. Jedoch sind pathogene *E.-coli*-Stämme auch für Infektionen des Magen-Darm-Traktes, der Harnwege, der Lunge und des Nervensystems verantwortlich. *E.-coli*-Kulturen nehmen damit einen bedeutenden Teil der Biosphäre ein<sup>(78, 79)</sup>.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden zwei *E. coli* K12-Bakterienstämme verwendet (s. Tabelle 2). Beide Stämme wurden vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als Lyophilisate

bezogen. Sie sind bevorzugte Modellorganismen in der biochemischen Genetik, Molekularbiologie und Biotechnologie<sup>(78)</sup>.

*E. coli* K-12-Kulturen sind prototroph, in definierten Medien sehr leicht kultivierbar und haben eine kurze Generationszeit. Daher erlaubt die Verwendung dieser Bakterien eine leichte und akkurate Analyse von großen Populationen sowie sehr selten eintretenden genetischen Ereignissen<sup>(80)</sup>.

**Tabelle 2:** Für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendeten *Escherichia coli*-Laborstämme mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordnet vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

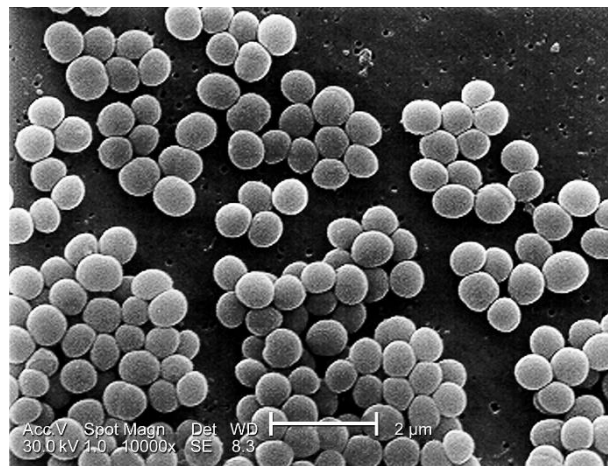
Bezeichnung	DSM Nummer	Wachstumstemperatur [°C]	Inkubationszeit [h]
K12 NCTC 10538 (O Rough H48)	11250	37	24
K12 MG1655 (Wildtyp)	18039	37	24

Der K 12-Laborstamm NCTC 10538 ist ein apathogener Keim, der unter anderem Anwendung in der Europäischen Norm DIN EN 1500:2013 "Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Hygienische Händedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2)" sowie in der DIN SPEC 91315 "Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen" als Modellorganismus findet<sup>(59, 60, 81)</sup>. Aufgrund seiner apathogenen Eigenschaft und seiner Anwendung in Normen sowie in den von Oehmigen *et al.*<sup>(28, 29, 54)</sup> durchgeführten Studien wurde dieser spezielle Laborkeim als Modellorganismus für die antimikrobiellen Testungen gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurde überdies der K 12-MG1655-Wildtyp-Stamm für mikrobiologische Untersuchungen angewendet. *E. coli* MG1655 ist ein pathogener Laborkeim, der nur minimal genetisch manipuliert wurde. Durch die Behandlung mit UV-Strahlung und Acridinorange wurde das Virusgenom vom temperenten Lambda-Bakteriophagen und das Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) aus diesem Stamm entfernt<sup>(78)</sup>. Diese Behandlungen resultieren in einer künstlich hervorgerufenen Mutation, einer sog. Leserasterverschiebung, am Ende des *rph*-Gens, das eine Ribonuklease in der Bakterien-DNA codiert. Dies wiederum führt zu einer Herunterregulierung des *pyrE*-Gens und der Ausbildung einer Pyridinmangelmutante<sup>(78, 82)</sup>. Die Vorteile dieses Wildtyp-Stammes liegen vor Allem darin, dass die komplette Genomsequenz dieses Modellorganismus durch Blattner *et al.*<sup>(78)</sup> entschlüsselt und eine Vielzahl von experimentellen Daten schon erhoben und veröffentlicht wurden. Dadurch konnte eine leistungsstarke

und zuverlässige mikrobiologische Analyse durchgeführt werden, die mit bestehenden Literaturdaten verglichen werden konnte.

### 4.5.1.2 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

*S. aureus* ist ein gramnegatives, kugelförmiges, in Haufen angeordnetes, nicht sporenbildendes, unbewegliches, fakultativ anaerobes, koagulasepositives, hämolytisches, ubiquitäres Bakterium, das der Familie der *Staphylococcaceae* zugeordnet ist<sup>(76)</sup>. In Abbildung 26 ist eine raster-elektronenmikroskopische Aufnahme solcher Bakterien dargestellt.



**Abbildung 26:** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von *Staphylococcus aureus*-Bakterien. (Bildquelle: CDC - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (ID# 11154), <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>).

Dieser Keim besiedelt vor allem die Haut und Mukosa des Menschen bzw. von warmblütigen Tieren. *S. aureus* ist zudem auf Lebensmitteln und in Gewässern sehr weit verbreitet. Seine human- und veterinärmedizinische Bedeutung liegt in seiner Rolle als typischer fakultativ pathogener Erreger mit stammabhängiger Virulenz. In der Lebensmitteltechnologie ist *S. aureus* relevant als Lebensmittelverderber und Toxinproduzent<sup>(76)</sup>. Typische Krankheitsbilder von *S. aureus* sind entzündliche Hauterkrankungen (Furunkel, Karbunkel), Muskelerkrankungen (Polyomyositis), Lungenentzündungen, Endokarditis, toxisches Schocksyndrom, Sepsis und Mastitis. Als Folge zunehmender multipler Resistenzen kann in der Praxis häufig nur eine erschwerte Eradikation des Erregers durchgeführt werden.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurde der Stamm *S. aureus* ATCC 6538 verwendet (s. Tabelle 3). Der vom Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als Lyophilisat bezogen wurde.

*S. aureus* ist ein chemoorganotropher, respiratorischer und fermentativer Erreger, der keine speziellen Ansprüche an den Nährboden stellt und in definierten Nährmedien mit einer kurzen Generationszeit leicht kultivierbar ist. Diese Eigenschaften erlauben eine leichte und akkurate

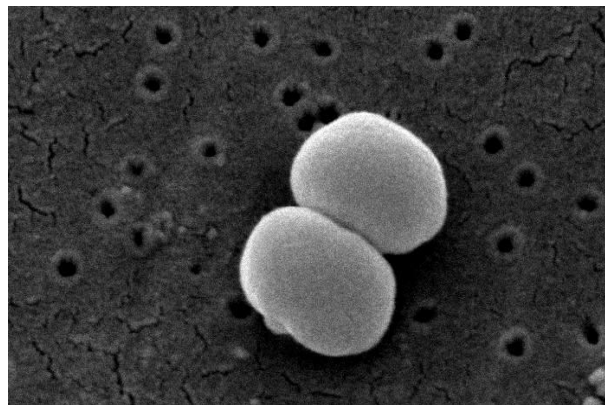
**Tabelle 3: Der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendete *Staphylococcus aureus* Laborstamm mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordert vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.**

Bezeichnung	DSM Nummer	Wachstumstemperatur [°C]	Inkubationszeit [h]
<i>Staphylococcus aureus</i>	799	37	24

Analyse von großen Populationen. Zudem wird dieser Laborkeim in der DIN SPEC 91315 "Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen" als Modellorganismus angewendet<sup>(59, 60)</sup>. In Anlehnung an dieses standardisierte Verfahren konnte eine gute erste Einschätzung der antimikrobiellen Effektivität von CAP-behandelten Flüssigkeiten erfolgen.

#### 4.5.1.3 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)

*S. epidermidis* ist ein grampositives, kugelförmiges, in Haufen angeordnetes, nicht bewegliches, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes und ubiquitäres Bakterium, das der Familie der *Staphylococcaceae* zugeordnet ist<sup>(74, 79, 83-85)</sup>. Eine rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von 2 grampositiven *S. epidermidis* ist in Abbildung 27 gezeigt. Es besiedelt vor



**Abbildung 27: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von zwei grampositiven *Staphylococcus epidermidis*-Bakterien. Quelle: CDC - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (ID# 259), <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=259>.**

allem die menschliche Haut und Mukosa<sup>(74, 76, 83-85)</sup>. Zudem ist *S. epidermidis* auf Lebensmitteln zu finden und kann Oberflächen von Polymeren besiedeln. Diese letzte Fähigkeit verleiht ihm seine medizinische Relevanz bei den sog. fremdkörperassoziierten Infektionen<sup>(76)</sup>. Für

Menschen mit einer intakten immunologischen Abwehr stellt das Bakterium keine Bedrohung dar, jedoch verursacht *S. epidermidis* nosokomiale Infektionen bei immunsupprimierten Patienten, wie z.B. AIDS-Patienten, alten multimorbiden Patienten oder Neugeborenen<sup>(83-85)</sup>. Häufig ruft eine Infektion mit *S. epidermidis* eine Sepsis, Endokarditis oder Meningitis hervor. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung und eine ausgeprägte Antibiotikaresistenz sind die Gründe, warum eine Eradikation von *S. epidermidis* in der Praxis häufig fehlschlägt und neue Therapieformen gefunden werden müssen<sup>(85)</sup>.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurde der Stamm *S. epidermidis* ATCC 14990 verwendet (s. Tabelle 4). Dieser Laborstamm wurde vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als Lyophilisat bezogen.

**Tabelle 4: Der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendete *Staphylococcus epidermidis* Laborstamm mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordert vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.**

Bezeichnung	DSM Nummer	Wachstumstemperatur [°C]	Inkubationszeit [h]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20044	37	24

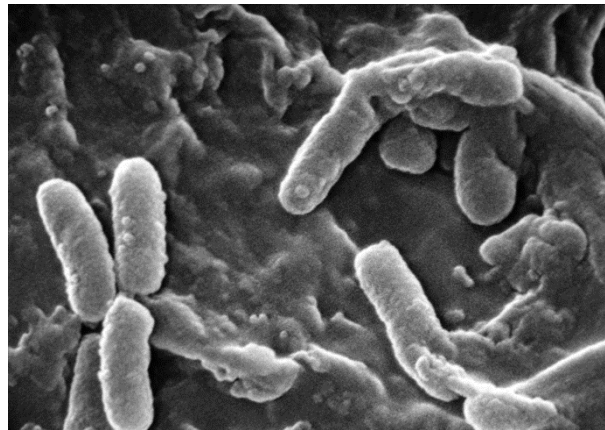
*S. epidermidis* ist ein saprophages Bakterium, das auch in einem Minimalmedium leicht kultivierbar ist und eine kurze Generationszeit hat. Diese Eigenschaften erlauben eine leichte und akkurate Analyse von großen Populationen. Zudem wird dieser Mikroorganismus in vielen dermatologischen Studien sowie in der DIN SPEC 91315 "Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen" als Modellorganismus angewendet<sup>(59, 60)</sup>. Dies ermöglichte einen guten Vergleich mit Literaturwerten und eine gewisse Einschätzung der antimikrobiellen Effektivität von CAP-behandelten Flüssigkeiten in Anlehnung an das standardisierte Verfahren zur Bewertung von medizinischen Plasmaquellen.

#### 4.5.1.4 *Pseudomonas aeruginosa* (**P. aeruginosa**)

*P. aeruginosa* ist ein gramnegatives, aerobes, oxidase- und katalasepositives, stäbchenförmiges, sporenloses, Hämolyse-fähiges, ubiquitäres Bakterium, das der Familie der *Pseudomonadaceae* zugeordnet ist. Auf der Zelloberfläche besitzt es büschelige lophotrische Flagellen/Geißeln, die dem Bakterium Motilität verleihen<sup>(74, 76, 86, 87)</sup>. Abbildung 28 zeigt eine REM Aufnahme gramnegativen *P. aeruginosa* Bakterien. *P. aeruginosa* verfügt über eine große Vielfalt von Virulenzfaktoren, wie z.B. das Exotoxin A oder die Phospholipase C<sup>(87)</sup>. Es ist ein opportunistisch pathogener Erreger, der ein breites Spektrum an Krankheiten hervorruft<sup>(74, 76, 86-88)</sup>.

Die häufigsten Erscheinungsbilder sind Pneumonien, Harnwegsinfektionen, Enterokolitis, Meningitis und die Otitis externa<sup>(86-88)</sup>. Für Patienten mit einem intakten Immunsystem stellt *P. aeruginosa* nur ein geringes Infektionsrisiko dar, jedoch verursacht es nosokomiale Infektionen bei immunsupprimierten Patienten, wie z.B. AIDS oder Neutropenie-Patienten<sup>(74, 76, 86, 88)</sup>.

*P. aeruginosa* ist auf der ganzen Welt verbreitet und besiedelt vor allem feuchte Gebiete, wie Abwässer und Böden<sup>(74, 76)</sup>. Jedoch ist dieser Keim auch bei ca. 20 % der Bevölkerung als Hautparasit in Achselhöhlen, der Analfalte und in der Mundhöhle zu finden<sup>(74)</sup>.



**Abbildung 28:** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von gramnegativen *Pseudomonas aeruginosa*-Bakterien. Quelle: CDC - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (ID# 232).

Für die mikrobiologischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 verwendet (s. Tabelle 5). Dieser Laborstamm wurde vom Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als Lyophilisate bezogen.

Pathogene *P.-aeruginosa*-Stämme sind gegenüber Umwelteinflüssen äußerst widerstandsfähig und besitzen durch ihre Autotrophie die Fähigkeit, sich aus einfachen anorganischen Verbindungen, CO<sub>2</sub> und Ammoniak alle essentiellen Aminosäuren selber zu synthetisieren<sup>(76)</sup>. Diese Eigenschaft ermöglicht es, dass dieser Keim auch in einem Minimalmedium leicht kultivierbar ist<sup>(76)</sup>. Darüber hinaus verfügt *P. aeruginosa* über eine kurze Generationszeit. Diese beiden

**Tabelle 5:** Der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendete *Pseudomonas aeruginosa* Laborstamm mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordnet vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

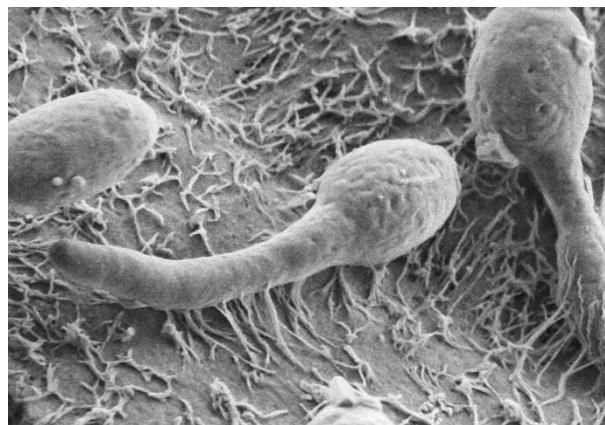
Bezeichnung	DSM Nummer	Wachstumstemperatur [°C]	Inkubationszeit [h]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50071	30	24-48

dungen, CO<sub>2</sub> und Ammoniak alle essentiellen Aminosäuren selber zu synthetisieren<sup>(76)</sup>. Diese Eigenschaft ermöglicht es, dass dieser Keim auch in einem Minimalmedium leicht kultivierbar ist<sup>(76)</sup>. Darüber hinaus verfügt *P. aeruginosa* über eine kurze Generationszeit. Diese beiden

Eigenschaften erlauben eine leichte und akkurate Analyse von großen Populationen. Zudem wird dieser Laborstamm in der DIN SPEC 91315 "Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen" als Modellorganismus angewendet<sup>(59, 60)</sup>. Dies ermöglichte eine gute erste Einschätzung der antimikrobiellen Effektivität von CAP-behandelten Flüssigkeiten in Anlehnung an das standardisierte Verfahren zur Bewertung von medizinischen Plasmaquellen. Außerdem machen seine Anpassungsfähigkeit und seine häufig ausgeprägte Resistenz ihn zu einem Problemkeim im Krankenhaus<sup>(76)</sup>. Die Entwicklung neuer Desinfektions- bzw. Sterilisationsverfahren zur Bekämpfung von *P. aeruginosa* sind daher sehr erstrebenswert.

### 4.5.1.5 *Candida albicans* (*C. albicans*)

*C. albicans* ist ein fakultativ pathogener, heterotropher, hefeähnlicher, ubiquitärer Pilz, welcher der Klasse der Saccharomycetes angehört<sup>(74, 76)</sup>. Da er über einem vom Cytoplasma abgegrenzten Zellkern verfügt, wird dieser Mikroorganismus den Eukaryoten zugeordnet<sup>(76, 79)</sup>. Abbildung 29 zeigt eine REM Aufnahme einzelner *C. albicans*-Organismen.



**Abbildung 29:** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von *Candida albicans*-Hefepilzen. Quelle: Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, <http://www.igb.fraunhofer.de/de/presse-medien/presseinformationen/2010/pathogene-hefen.html>.

*C. albicans* tritt meist an feuchten Standorten auf, die reich an Zuckern sind. Man findet diesen Erreger häufig in Fruchtsäften, verunreinigtem Wasser und auf Pflanzen<sup>(76)</sup>. Bei der Bevölkerung ist *C. albicans* häufig als kommensaler Organismus auf den Schleimhäuten des Mund- und Rachenraumes sowie im Genitalbereich und im Verdauungstrakt anzufinden<sup>(74, 76)</sup>. Bei immunsupprimierten Patienten, wie z.B. AIDS- oder Krebspatienten, treten vermehrt endogene Infektionen auf, die sich in den meisten Fällen auf den Schleimhäuten manifestieren. Häufige Krankheitsbilder sind Organmykosen aber auch Meningitiden<sup>(74)</sup>.

Für die mikrobiologischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm *C. albicans* ATCC 10231 verwendet (s. Tabelle 6). Dieser Laborstamm wurde vom



Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als Lyophilisate bezogen.

**Tabelle 6: Der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendete *Candida albicans* Hefepilz mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordert vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell-kulturen GmbH.**

Bezeichnung	DSM Nummer	Wachstumstemperatur [°C]	Inkubationszeit [h]
<i>Candida albicans</i>	1386	25-30	48

Auf Sabouraud-Glukose-Agar bildet *C. albicans* bei einer Temperatur von 25 bis 30 °C bereits nach 48 Stunden weißliche, glatte und leicht gewölbte Kolonien aus. Dies erlaubt eine leichte und akkurate Analyse von großen Populationen. Zudem wird dieser Laborstamm in der DIN SPEC 91315 "Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen" als Modellorganismus angewendet<sup>(59, 60)</sup>. Dies ermöglichte eine gute Einschätzung der antimikrobiellen Effektivität von CAP-behandelten Flüssigkeiten in Anlehnung an das standardisierte Verfahren zur Bewertung von medizinischen Plasmaquellen.

## 4.5.2 Mikrobiologische Methoden

### 4.5.2.1 Reagenzien und Chemikalien für die mikrobiologischen Analysen

Für die durchgeführten mikrobiologischen Analysen wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Materialien und Geräte verwendet.

**Tabelle 7: Verwendete Reagenzien und Chemikalien für die mikrobiologischen Analysenverfahren**

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
CASO-Agar, granuliert	Merck KGaA, Darmstadt, D
CASO-Bouillon, granuliert	Carl Roth ® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Sabouraud 4 % Glucose-Agar	Carl Roth ® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Sabouraud 2 % Glucose-Bouillon	Carl Roth ® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Columbia-Blut-Agar-Platten	VWR, Darmstadt, D
Mueller-Hinton-II-Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
NaCl, >99,9%, Cellpure	Carl Roth ® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Trypton (Tryptone, Powder)	Amresco LLC, Solon, Ohio, USA
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer): 0,372 g/l EDTA-Na <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

1,211 g/l Tris	
DEPC BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
DNase I	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Jodessigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Phenol (wassergesättigt, stabilisiert)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Tris-HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ )	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethanol 70 % (DAB)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethanol 96 % (DAB)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Salzsäure	Merck, Darmstadt, D
Eisessig	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Gasket slide, 8 HD Arrays/Slide	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D
Triton X-102	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D
RNA Spike In Kit <ul style="list-style-type: none"> <li>• WT Primer</li> <li>• RNA spike-in</li> </ul>	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D
LowInput QuickAmp Labeling Kit One-Color <ul style="list-style-type: none"> <li>• T7 Primer</li> <li>• 5X First Strand Buffer</li> <li>• DTT</li> <li>• dNTP Mix</li> <li>• AffinityScript RNase Block Mix</li> <li>• 5X Transkriptionspuffer</li> <li>• NTP Mix</li> <li>• T7 RNA-Polymerase Blend</li> <li>• Nuclease-freies Wasser</li> <li>• Cyanine 3-CTP</li> </ul>	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D
Gene Expression Hybridisierungs- kit <ul style="list-style-type: none"> <li>• 25x Fragmentierungspuffer</li> <li>• 10x Blocking Agent</li> </ul>	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D

• Nuclease-freies Wasser	
SSPE Wasch-Puffer Pack (gebrauchsfertig)/ Genexpressionswaschpuffer 1 und 2 (GE- Waschpuffer)	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Darmstadt, D
BD Sensi-Disc™ Amikacin, 30 µg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD Sensi-Disc™ Ampicillin, 10 µg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD Sensi-Disc™ Cefazolin, 30 µg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD Sensi-Disc™ Gentamicin, 10 µg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD Sensi-Disc™ Tobramycin, 10 µg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD Sensi-Disc™ Tetracyclin, 30 µg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD Sensi-Disc™ Ticarcillin, 75 µg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BD Sensi-Disc™ Trimethoprim, 5 µg	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Konz. Salzsäure (HCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D
Konz. Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, D

#### 4.5.2.2 Herstellung der verwendeten Nährmedien und Lösungen

##### CASO-Bouillon:

30 g CASO-Bouillon-Granulat wurden in 1 l demineralisiertem Wasser gelöst, anschließend bei 121 °C 20 min autoklaviert und bei ca. 6 °C gelagert.

##### CASO-Agar-Platten:

Für die CASO-Agar-Platten wurden 20 g CASO-Agar-Granulat in 0,5 l demineralisiertem Wasser auf einem Magnetrührer mit Heizplatte gelöst und aufgekocht, bis die damit hergestellte CASO-Agar-Lösung klar wurde. Anschließend wurde die CASO-Agar-Lösung 20 min bei 121 °C autoklaviert, unter der Sicherheitswerkbank in sterile 90 mm Petrischalen gegossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. So konnte eine Kontamination der hergestellten CASO-Agar-Platten ausgeschlossen werden. Danach erfolgte die weitere Lagerung bei ca. 6 °C.

##### Sabouraud 2 % Glucose-Bouillon:

30 g Sabouraud-Bouillon-Granulat wurden in 1 l demineralisiertem Wasser auf einem Magnetrührer mit Heizplatte gelöst und aufgekocht, anschließend bei 121 °C 20 min autoklaviert und bei ca. 6 °C gelagert.

### Sabouraud 4 % Glucose-Agar:

Für die Sabouraud-Agar-Platten wurden 32,5 g Sabouraud-Agar-Granulat in 0,5 l demineralisiertem Wasser auf einem Magnetrührer mit Heizplatte gelöst und aufgeköcht, bis die damit hergestellte Sabouraud-Agar-Lösung klar wurde. Anschließend wurde die Sabouraud-Agar-Lösung 20 min bei 121 °C autoklaviert, unter der Sicherheitswerkbank in sterile 90 mm Petrischalen gegossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. So konnte eine Kontamination der hergestellten Sabouraud-Agar-Platten ausgeschlossen werden. Danach erfolgte die weitere Lagerung bei ca. 6 °C.

### Mueller-Hinton-II-Agar-Platten:

Für die Mueller-Hinton-II-Agar-Platten wurden 38 g CASO-Agar-Granulat in 1 l demineralisiertem Wasser auf einem Magnetrührer mit Heizplatte gelöst und für 1 min aufgeköcht, bis die damit hergestellte Mueller-Hinton-II-Agar-Lösung klar wurde. Anschließend wurde diese für 20 min bei 121 °C autoklaviert, unter der Sicherheitswerkbank in sterile 90 mm Petrischalen gegossen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. So konnte eine Kontamination der hergestellten Mueller-Hinton-II-Agar-Platten ausgeschlossen werden. Danach erfolgte die weitere Lagerung bei ca. 6 °C.

### Verdünnungsflüssigkeit (VF):

Es wurden 8,5 g NaCl und 1 g Trypton in 1 l demineralisiertem Wasser gelöst, anschließend bei 121 °C 20 min autoklaviert und bei ca. 6 °C gelagert.

### Acetat-EDTA-Puffer (AE-Puffer):

Es wurden 272 mg Natriumacetat x 3 H<sub>2</sub>O und 37,2 mg Natrium-EDTA x 2 H<sub>2</sub>O in 100 ml demineralisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 5,5 eingestellt und die Lösung bei 121 °C 20 min autoklaviert und bei ca. 6 °C gelagert.

### Natriumacetat:

Es wurden 27,22 g Natriumacetat x 3 H<sub>2</sub>O 27,22 g in 100 ml demineralisiertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit Eisessig auf 5,5 eingestellt, anschließend bei 121 °C 20 min autoklaviert und bei ca. 6 °C gelagert.

#### DNase-Puffer:

Es wurden 0,48 g Tris-HCl (40 mM) und 0,12 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  (6 mM) in 100 ml demineralisiertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,5 eingestellt, anschließend bei 121 °C 20 min autoklaviert und bei ca. 6 °C gelagert.

#### **4.5.2.3      Reaktivierung von Bakterientrockenkulturen**

Die von der DSMZ geordneten Bakterientrockenkulturen und die Hefekultur wurden entsprechend der mitgelieferten Anleitung reaktiviert. Unter Verwendung einer Bunsenbrennerflamme wurde das spitze Ende der Doppel-Ampulle, welche die Trockenkultur beinhaltet, stark erhitzt. Mit einer Pasteurpipette wurden 2-3 Tropfen Wasser auf die heiße Spitze geträufelt, was zum Zerspringen des Glases führte. Das gesprungene obere Ende der Ampulle wurde mit einer Pinzette vorsichtig abgeklopft und das innen liegende Isoliermaterial entfernt. Mit einer sterilen Pinzette wurde das innere Röhrchen herausgeholt und der Baumwollstopfen beseitigt. Zum Zweck der Dekontamination wurde der obere Rand des Röhrchens in der blauen Flamme eines Bunsenbrenners abgeflammt. Das freiliegende Zellpellet wurde mit 0,5 ml steriler CASO-Bouillon versetzt und für 30 min bei RT quellen gelassen. Nach der Quellperiode wurde der Inhalt des Röhrchens mit einer sterilen Impföse gut durchmischt und in ein Reagenzglas mit 5 ml CASO-Bouillon überführt. Zur Reinheitskontrolle wurde zusätzlich eine Ausstrichkultur auf einer Columbia-Agarplatte angelegt. Die so gewonnenen Flüssig- und Agarkulturen wurden bei einer Temperatur von 37°C für 18-24 h im Brutschrank inkubiert.

#### **4.5.2.4      Ansetzten einer Übernachtskultur**

Zur Testung der biologischen Effekte von Plasma und plasmabehandelten Flüssigkeiten in mikrobiologischen Versuchen mussten Übernachtskulturen gezüchtet werden. Hierfür wurden unter aseptischen Bedingungen in einem sterilen Erlenmeyerkolben 25 ml CASO-Bouillon (Merck GmbH, Deutschland) als Nährmedium vorgelegt. Mit einer sterilen Impföse wurden von einer Columbia-Agarplatte ein bis zwei vereinzelte Bakterienkolonien einer Dauerkultur aufgenommen und in die CASO-Bouillon überführt. Zum Aufbrechen von Bakterienagglomeraten wurde die inokulierte Impföse an der Wand des Erlenmeyerkolbens sanft gerieben und die Bakterien in der Nährbouillon suspendiert. Die beimpfte CASO-Bouillon wurde für eine gesteigerte Homogenisierung vorsichtig geschüttelt und unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C über Nacht inkubiert (14 - 18 h).

#### 4.5.2.5 Herstellung von Bakterienstammsuspensionen

Bevor antimikrobielle Plasmaeffekte experimentell getestet werden konnten, musste ein weiterer Aufbereitungsprozess für die abschließende Probenvorbereitung durchgeführt werden. Eine in der stationären Phase befindliche Übernachtskultur wurde durch saches Schwenken des Erlenmeyerkolbens homogen in der Nährbouillon verteilt. Unter aseptischen Umgebungsbedingungen wurde ein Aliquot von 9 ml in ein 15 ml Falcon überführt und bei 4000 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der klare Überstand verworfen und das gewonnene Zellpellet dreimal mit steriler NaCl-Lösung gewaschen. Das Resuspendieren der Bakterien erfolgte in 3 ml steriler NaCl-Lösung unter Verwendung eines Vortexers zum homogen Verteilen der Organismen im Medium. Für die Versuche wurde die konzentrierte Bakterienstammsuspension in einem letzten Schritt 1:50 mit steriler NaCl-Lösung verdünnt. Diese empirisch entwickelte Vorgehensweise resultiert in einer Bakterienendkonzentration von ca.  $10^7$  KbE/ml. Zur Prüfung der versuchsspezifischen Bakterienausgangskonzentration wurden Verdünnungsreihen (siehe Abschnitt 4.5.2.6) angefertigt und die Zahl der vermehrungsfähigen Mikroorganismen mit Hilfe des Spatelplattenverfahrens (siehe Abschnitt 4.5.2.7) experimentell ermittelt.

#### 4.5.2.6 Herstellen einer Verdünnungsreihe

Mit einer Ausgangskonzentration von ca.  $10^7$  KbE/ml liegt die Anzahl der Mikroorganismen in den verwendeten Probensuspensionen oberhalb des Erfassungsbereiches des Spatelplattenverfahrens (siehe Abschnitt 4.5.2.7;  $\sim 10^3$  KbE/ml). Um alle Proben quantitativ bestimmen zu können, wurden die Zellsuspensionen vor der Zellzahlbestimmung über mehrere, aufeinanderfolgende Dezimalschritte (1:10) verdünnt (s. Abbildung 30). Das Anlegen von Dezimalverdünnungsreihen erfolgte unter aseptischen Bedingungen in sterilen Reagenzgläsern durch Zugabe

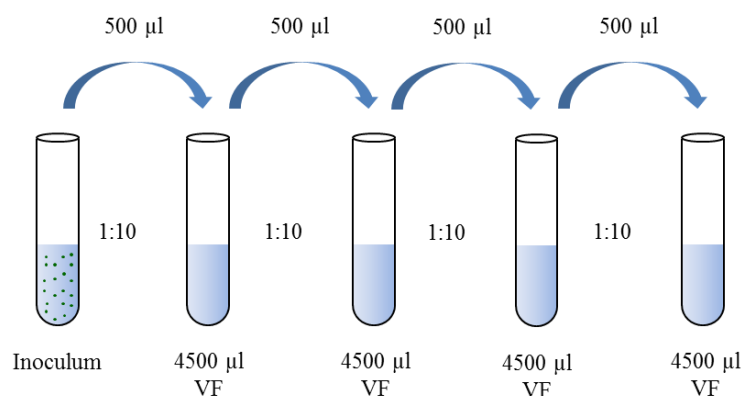


Abbildung 30: Schematische Darstellung einer 1:10 Verdünnungsreihe.

von jeweils 500 µl Probensuspension zu 4500 µl steriler Verdünnungsflüssigkeit (VF; 0,85% NaCl; 1% Trypton in Aqua Dest.).

#### 4.5.2.7 Spatelplattenverfahren

Die antimikrobiellen Effekte von kalten CAP auf planktonische Mikroorganismen lassen sich am besten über eine Lebendzellzahlbestimmung systematisch charakterisieren. Das in der Mikrobiologie standardisierte Spatelplattenverfahren wurde in der vorgelegten Arbeit für diesen Zweck verwendet. Hierfür wurden die Proben entweder manuell oder durch ein Spiralplattensystem ausplattiert.

##### Manuelles Ausplattieren:

Beim manuellen Ausplattieren wurden 100 µl Aliquote der zu betrachtenden Dezimalverdünnungen auf Agarplatten pipettiert und mit einem Drigalskispatel auf der Agaroberfläche homogen verteilt. Zusätzlich wurden 500 µl unverdünnte Bakteriensuspension (0. Verdünnungsstufe) auf CASO-Agarplatten pipettiert und ausgestrichen. Für jede betrachtete Verdünnungsstufe wurden 2-3 Stichproben ausplattiert. Die inokulierten Agarplatten wurden bei einer Temperatur von 37° C unter aeroben Bedingungen für 16-18 h inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe eines softwaregestützten automatischen Koloniezählers CounterMat Flash & Go 5.0 der Firma IUL Instruments (IUL S.A. Barcelona, Spanien) ermittelt, wobei das Zählergebnis für die 0. Verdünnung mit dem Faktor 2 multipliziert wurde. Für die nachfolgenden Verdünnungen (1-X) erfolgte eine einfache Zählung und es kam kein Multiplikationsfaktor zum Einsatz. Die Zählergebnisse wurden für die Berechnung der Lebendzellzahl verwendet (Abschnitt 4.5.2.8).

Für jedes Experiment wurden zwei Negativkontrollen ( $K_{neg}$ ) mitgeführt. Als Negativkontrolle für die direkte bzw. indirekte Plasmabehandlung wurden entweder unbehandelte Bakteriensuspensionen oder unbehandelte NaCl-Lösungen (0,85 %), die anschließend mit den Testmikroorganismen versetzt wurden, verwendet. Die erste  $K_{neg}$  eines Experimentes wurde am jeweiligen Versuchstag immer direkt vor dem Beginn der Plasmabehandlung und die zweite  $K_{neg}$  immer direkt nach der letzten Plasmabehandlung gezogen, verdünnt und ausplattiert. Dieses Vorgehen diente zur individuellen Inprozesskontrolle jedes einzelnen Experimentes. Hiermit wurde die Stabilität der Bakterienstammsuspension über die komplette Versuchsdauer geprüft.

### Spiralplattenverfahren:

Beim automatischen Ausplattieren mit Hilfe des Spiralplattensystem Eddy-Jet 2 (IUL Instruments GmbH, Deutschland) wurden 50 µl Aliquote der zu betrachtenden Dezimalverdünnung spiralförmig auf CASO-Agarplatten aufgetragen, welche anschließend bei 37° C unter aeroben Bedingungen für 16-18 h inkubiert wurden. Anhand der gewachsenen Kolonien wurde mit Hilfe des Software-gestützten automatischen Koloniezählers Countermat Flash & Go 5.0 der Firma IUL Instruments (IUL S.A. Barcelona, Spanien) die Lebendzellzahlen der behandelten Proben ermittelt.

#### **4.5.2.8 Berechnung der Lebendzellzahl**

Aus den Ergebnissen des manuellen Spatelplattenverfahrens kann die Lebendzellzahl nach der folgenden Formel berechnet werden<sup>(89)</sup>:

$$m = \frac{10^x}{v} \cdot \frac{\sum c_x + \sum c_{x+1}}{n_x + 0,1 n_{x+1}}$$

$m$	=	gewogener Mittelwert der Lebendzellzahl in 1 ml der verdünnten Probe
$10^x$	=	Verdünnungsfaktor für die niedrigste ausgewertete Verdünnungsstufe $10^x$
$v$	=	pro Platte eingesetztes Volumen der (verdünnten) Zellsuspension in ml
$\sum c_x$	=	Gesamtzahl der Kolonien auf allen ( $n_x$ ) Platten der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe $10^x$
$\sum c_{x+1}$	=	Gesamtzahl der Kolonien auf allen ( $n_{x+1}$ ) Platten der nächsthöheren ausgewerteten Verdünnungsstufe $10^{(x+1)}$ .

Der auszuwertende Detektionsbereich der Koloniendichte wurde auf 1 bis 350 Kolonien pro Platte festgesetzt, woraus sich eine untere Nachweisgrenze der Methode von 10 koloniebildenden Einheiten pro ml (KbE/ml) ergibt. Die obere Nachweisgrenze wird damit begründet, dass bei einer Koloniendichte oberhalb von 350 die einzelnen Kolonien nicht genau voneinander abgegrenzt werden können. Die festgelegten Nachweisgrenzen stellen somit einen Kompromiss zwischen statistischer Genauigkeit und einem geringen systematischen Fehler dar.

#### **4.5.2.9 Berechnung des logarithmischen Reduktionsfaktors**

Eine weitere Möglichkeit, die antimikrobiellen Eigenschaften von Plasma oder plasmabehandelten Flüssigkeiten zu charakterisieren besteht darin, auf der Basis der Bestimmung der Zahl



der koloniebildenden Einheiten einen Reduktionsfaktor nach der folgenden Gleichung zu ermitteln:

$$RF = \log_{10} N_0 - \log_{10} N_x$$

$\log_{10} N_0$  =  $\log_{10}$  der unbehandelten Kontrollsuspension (log. Ausgangskonzentration)

$\log_{10} N_x$  =  $\log_{10}$  der behandelten Bakteriensuspension (log. Endkonzentration)

Der Reduktionsfaktor stellt rechnerisch die Keimreduktionsleistung der Plasmabehandlung dar, die die logarithmische Verringerung einer initialen Ausgangskeimlast beziffert.

#### 4.5.2.10 Quantitativer Suspensionsversuch

Die keimreduzierende Wirkung von plasmabehandelten Flüssigkeiten auf planktonischen Mikroorganismen lässt sich vorzugsweise über eine Lebenszellzahlbestimmung systematisch charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde die bakterizide Wirkung analog der Norm DIN EN 1040:2006-03 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung (Basistest) chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1); Deutsche Fassung EN 1040:2005.“ bestimmt. Dazu wurden 100 µl einer frischen Bakterienstammsuspension unter aseptischen Bedingungen in ein Reagenzglasüberführt und mit 4900 µl einer plasmabehandelten Natriumchlorid-Lösung versetzt. Nach einer entsprechenden Einwirkzeit wurden die Proben in Dezimalschritten in Verdünnungsflüssigkeit (VF) verdünnt. Mit der Verdünnung der Proben wurde auch die antiseptische Wirkung der Plasma-behandelten Flüssigkeit abgestoppt. Nach Anlegen der Verdünnungsreihe wurden 100 µl Aliquote auf CASO-Agarplatten ausplattiert und bei einer Temperatur von 37° C über Nacht (16-18 h) im Brutschrank inkubiert. Für jede Verdünnungsstufe, auf der die geeignete Zellkonzentration erwartet wurde, wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Für die Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsmittel hat die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) bereits 1958 ihre Richtlinien veröffentlicht, welche im Jahr 2001 ihre letzte Aktualisierung erfahren hat<sup>(90)</sup>. Demnach soll die Verminderung der Koloniezahl im Suspensionsversuch für Bakterien und Pilze mindestens 5 Zehnerpotenzen betragen<sup>(49, 91-93)</sup>. Gegenüber Viren wird eine Reduktion von 4 Zehnerpotenzen als Mindestanforderung an ein in Deutschland zugelassenes Desinfektionsmittel gestellt<sup>(94)</sup>.

#### **4.5.2.11 Methodik zur Transkriptom-Analyse**

##### **4.5.2.11.1 Experimentelles Setup zur Plasmabehandlung von Flüssigkeiten und MO-Suspensionen für die Transkriptom-Analyse**

Bei der direkten Behandlung von Bakteriensuspensionen betrug die Plasmabehandlungszeit  $t_1 = 45$  s und die Einwirkzeit  $t_3 = 20$  min.

Bei der indirekten Behandlung von Bakterien mit plasmabehandelten NaCl-Lösungen betrug die Plasmabehandlungszeit  $t_1 = 1,5$  min. Die NaCl-Lösungen wurden direkt nach erfolgter Plasmabehandlung mit den *E. coli* beimpft (d.h.  $t_2 = 0$  min) und die Einwirkzeit ( $t_3$ ) auf die Bakterien betrug 20 min.

##### **4.5.2.11.2 Isolierung der Gesamt-RNA**

Die Ribonukleinsäure (RNA, engl. Ribonucleic acid) ist neben der Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. Deoxyribonucleic acid) als Träger der Erbinformation eine weitere im Organismus befindliche Nukleinsäure. Eine der wesentlichen Funktionen der RNA in biologischen Systemen ist die Umsetzung von der in der DNA gespeicherten genetischen Information in Proteine via Transkription, Translation und Proteinbiosynthese. RNA-Moleküle sind wertvolle zelluläre Informationsspeicher, die molekularbiologisch aus der Zelle isoliert und zur Datengewinnung weiterverarbeitet werden können. Die Isolation der Gesamt-RNA aus *E. coli* erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Oelmüller *et al.* <sup>(95)</sup> und basierte auf einer klassischen Phenolextraktion. Hierbei wurden 1,2 ml saure Phenol-Lösung (Phenol, wassergesättigt, stabilisiert, pH 4,0; AppliChem, Darmstadt) in ein sterilisiertes 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 15 µl 25 %iger SDS-Lösung versetzt und auf 65 °C temperiert. Während der Aufwärmphase wurde das Probenmaterial für die Extraktion gewonnen. Aufgrund der kleinen Behandlungsvolumina und der damit verbundenen geringen Anzahl an suspendierten Zellen mussten für die Isolation der Gesamt-RNA zehn Proben in einem Pool zusammengeführt werden. Aufgrund des experimentellen Aufbaus der Epoxidharz-DBE 2 konnten pro Versuch zwei Bakteriensuspensionen bzw. NaCl-Lösungen parallel mit Plasma behandelt werden. Die beiden direkt bzw. indirekt behandelten Proben wurden in 15 ml Falkons überführt, bei 4700 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen (Definition der Behandlungsparameter s.u.). Um die Degeneration der RNA zu verhindern, wurde das Zellpellet sofort in 200 µl eiskalte Ethanol/Phenol-Fixierlösung (5 % wassergesättigtes Phenol pH < 7 in 96 %igen Ethanol) resuspendiert und auf Eis gelagert. Die Expositionszeit der Fixierlösung betrug mindestens 3 min. Das beschriebene Prozedere wurde fünfmal wiederholt um die nötige Menge an biologischem Material für ein technisches Replikat in einem Pool zu vereinigen. Hierfür wurden die fünf fixierten

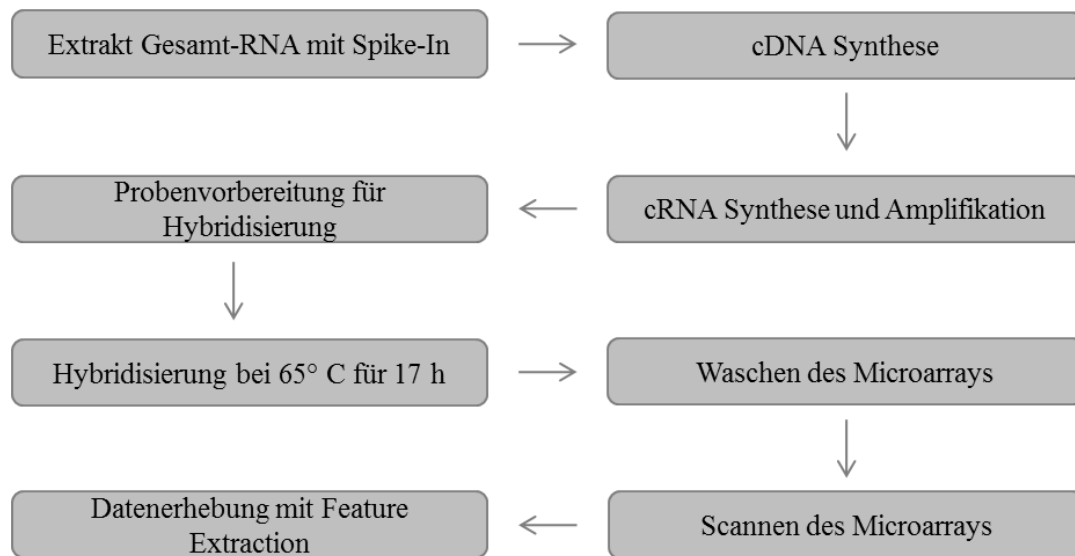
Zellsuspensionen in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 16.000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgetrennt, während das Zellpellet in 600 µl AE-Puffer resuspendiert und sofort in die 65 °C heiße Phenol-SDS-Lösung transferiert wurde. Das Extraktionsgemisch wurde durch 10-faches Invertieren durchmischt und bei 65 °C für 10 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Reaktionsgefäß mehrmals ca. alle 60 s erneut invertiert. Zur vollständigen Trennung der beiden Phasen wurde das Reaktionsgefäß anschließend bei 16.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl einer 2 molaren Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) versetzt. Dem Gemisch wurden 600 µl saure Phenol-Lösung hinzugefügt, das Reaktionsgefäß verschlossen und mehrmals invertiert. Eine erneute Phasentrennung erfolgte durch 15 min Zentrifugieren bei 9.000 g und 4 °C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem 2,5-fachen Volumenanteil von 96 %igen Ethanol (reinst, auf Eis) versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte bei einer Temperatur von -20 °C und einer minimalen Inkubationszeit von 2 h (konnte auch über Nacht erfolgen).

Nach der Fällung wurde das Ethanol-Wassergemisch bei 4 °C und 16.000 g für 60 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Das Fällungsprodukt wurde unter aseptischen Bedingungen für 15-20 min luftgetrocknet. Der trockene Niederschlag wurde in 15 µl TE-Puffer (1:100 verdünnt) resuspendiert, mit 180 µl DNase-Puffer und 5 µl DNase I (RNase-freie DNase) versetzt und bei einer Temperatur von 37 °C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Dem Gemisch wurden erst 15 µl 2 mol Natriumacetat-Lösung (pH 5,2), dann 500 µl saure Phenol-Lösung beigelegt und anschließend mehrmals invertiert. Zur vollständigen Trennung der beiden Phasen wurde das Reaktionsgefäß bei 9.000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit einem 2,5-fachen Volumenanteil von 96 %igen Ethanol (reinst, auf Eis) versetzt. Die erneute Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von -20 °C.

Nach erfolgter Fällung wurde das Ethanol-Wassergemisch bei 4 °C und 16.000 g für 60 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und das Fällungsprodukt unter aseptischen Bedingungen für 15-20 min luftgetrocknet. Der trockene Niederschlag wurde in 15 µl TE-Puffer (1:100 verdünnt) resuspendiert und die RNA sofort mittels eines NanoDrop Spektrometers quantifiziert. Dazu wurden 1,5 µl der Zellsuspension spektralphotometrisch vermessen. Proben mit ausreichend hoch konzentrierter RNA wurden bis zur Weiterverarbeitung mittels microarraybasierten Genexpressionsanalyse bei einer Temperatur von -70 °C gelagert.

#### 4.5.2.11.3 One-Color microarraybasierte Genexpressionsanalyse

Für die One-Color microarraybasierte Genexpressionsanalyse wurde ein kommerziell erhältliches Low Input Quick Amp WT Labeling Kit der Firma Agilent Technologies verwendet. Das Nachweisprinzip beruht auf der Herstellung von cRNA (komplementäre RNA), welche mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und auf ein Microarray hybridisiert wird. Entsprechend des Anwenderprotokolls wurde die isolierte Gesamt-RNA (s. Abschnitt 4.5.2.11.2) nach dem in Abbildung 31 skizzierten Ablauf aufgearbeitet, auf das Array aufgebracht und die gewonnenen Daten ausgelesen.



**Abbildung 31:** Schematische Darstellung des Ablaufes der One-Color microarraybasierte Genexpressionsanalyse

#### 4.5.2.11.4 Synthese, Markierung und Amplifikation von cRNA

Für jedes Array wurden in einem 1,5 ml PCR-Gefäß eines PCR-Gefäßstreifens 50 ng der isolierten Gesamt-RNA in 2,3 µl RNase-freiem Wasser suspendiert und auf Eis gelagert. Den jeweiligen Proben wurden 3 µl eines WT Primer Master Mixes (s. Tabelle 8) zugefügt und bei einer Temperatur von 65° C für 10 min in einem PCR-Thermocycler inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden zum Abstoppen der Reaktion für 5 min auf Eis gelagert.

**Tabelle 8:** Bestandteile und Zusammensetzung vom WT Primer Master Mix.

Komponente	Volumen [µl] pro Reaktion	Volumen [µl] pro 5 Reaktionen	Volumen [µl] pro 10 Reaktionen
WT Primer	1	5	10
Verdünnte RNA spike-in Kontrollen	2	10	20
Gesamtvolumen	3	15	30

Der PCR-Gefäßstreifen mit den Proben wurde für 10 s zentrifugiert, um den gesamten Inhalt vom Deckel und den Gefäßwänden in die Mitte der Reaktionsgefäße zu befördern. In jedes Reaktionsgefäß wurden 4,7 µl eines cDNA Master Mixes (s. Tabelle 9) pipettiert und für 2 h bei 40° C im PCR-Thermocycler inkubiert.

**Tabelle 9: Bestandteile und Zusammensetzung vom cDNA Master Mix.**

Komponente	Volumen [µl] pro Reaktion	Volumen [µl] pro 5 Reaktionen	Volumen [µl] pro 10 Reaktionen
5X First Strand Buffer	2	10	20
0,1 M DTT	1	5	10
10 mM dNTP mix	0,5	2,5	5
AffinityScript RNase Block Mix	1,2	6	12
Gesamtvolumen	4,7	23,5	47

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für weitere 15 min bei 70° C bebrütet. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben erneut für 5 min auf Eis gelagert. Der PCR-Gefäßstreifen mit den Proben wurde für 10 s zentrifugiert, um den gesamten Inhalt vom Deckel und den Gefäßwänden in die Mitte der Reaktionsgefäße zu befördern. Den jeweiligen Proben wurden 6 µl eines Transcription Master Mix (s. Tabelle 10) zugefügt und vorsichtig durch Invertieren gemischt.

**Tabelle 10: Bestandteile und Zusammensetzung vom Transcription Master Mix.**

Komponente	Volumen [µl] pro Reaktion	Volumen [µl] pro 5 Reaktionen	Volumen [µl] pro 10 Reaktionen
Nuklease-freies Wasser	0,75	3,75	7,5
5X Transkriptionspuffer	3,2	16	32
0,1 M DTT	0,6	3	6
NTP Mix	1	5	10
Cyanine-3-CTP	0,24	1,2	2,4
T7 RNA-Polymerase Blend	0,21	1,05	2,1
Gesamtvolumen	6	30	60

#### **4.5.2.11.5 Reinigung und Quantifizierung der markierten und amplifizierten cRNA**

Zur Reinigung der cRNA wurde das kommerziell erhältliche RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die nach dem in Abschnitt 4.5.2.11.2 beschriebenen Verfahren gewonnenen cRNA-Proben wurden langsam durch eine Lagerung auf Eis aufgetaut und anschließend mit 84 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt. Den Probensuspensionen wurden 350 µl RLT-Puffer

(Lysispuffer) beigelegt und durch vorsichtiges Invertieren gut durchmischt. Dem cRNA-Proben wurden 250 µl Ethanol (96-100%) hinzugefügt und nochmals durch Invertieren gemischt. Die Probensuspensionen wurden auf RNeasy-Minisäulen aufgebracht, welche in einem 2 ml Sammelbehälter platziert wurden. Die einzelnen Reaktionsgefäße wurden bei einer Temperatur von 4° C und 13000 rpm für 30 s zentrifugiert. Die abgetrennten flüssigen Phasen wurden samt Sammelbehälter verworfen und die cRNA-beinhaltenen Säulen in frische 2 ml Sammelbehälter überführt. Auf die Trennsäulen wurden 500 µl eines Ethanol-haltigen RPE-Waschpuffers pipettiert und bei einer Temperatur von 4° C und 13000 rpm für 30 s zentrifugiert. Die abgetrennten flüssigen Phasen wurden verworfen und die Sammelbehälter für den zweiten Reinigungsschritt wiederverwendet. Auf die Trennsäulen wurden weitere 500 µl des Ethanol-haltigen RPE-Waschpuffers pipettiert und bei 4° C und 13000 rpm für 30 s zentrifugiert. Die abgetrennten flüssigen Phasen wurden samt Sammelbehälter verworfen und die cRNA-beinhaltenen Säulen in frische 1,5 ml Sammelbehälter überführt. Die aufgereinigte cRNA wurde durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser (direkt auf die Filtermembran pipettiert) eluiert. Nach 60 s Wartezeit wurden die Proben bei 4° C und 13000 rpm für 30 s zentrifugiert. Das Elutionsmittel beinhaltete die aufgereinigte cRNA und wurde permanent auf Eis gelagert. Mittels NanoDrop-Technologie wurden die einzelnen Proben bei  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm spektralphotometrisch gegen RNase-freies Wasser vermessen, wodurch die folgenden Werte bestimmt werden:

- Cyanine 3 (Cy3) Farbkonzentration [pmol/µl]
- Verhältnis der RNA-Absorption [260 nm/280 nm]
- cRNA-Konzentration [ng/µl]

Anhand dieser Daten wurde die Ausbeute ( $m_{cRNA}$ , [µg]) und spezifische Aktivität (SA, [pmol Cy3/µg cRNA]) der markierten, amplifizierten und aufgereinigten cRNA-Proben unter Verwendung der nachfolgenden Gleichungen berechnet:

$$m_{cRNA} = \frac{cRNA - \text{Konzentration} \times 30 \mu\text{l Elutionsmittel}}{1000}$$

$$SA = \frac{Cy3 - \text{Farbkonzentration} \times 1000}{cRNA - \text{Konzentration}}$$

Tabelle 11 fasst die für die Hybridisierung empfohlenen Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten der Proben zusammen.

**Tabelle 11: Ausbeuten und spezifische Aktivitäten für die Hybridisierung der entsprechenden Microarrays.**

Format Microarray	Ausbeute [ $\mu\text{g}$ ]	Spezifische Aktivität [ $\text{pmol Cy3}/\mu\text{g cRNA}$ ]
1-Kammer	5	15
2-Kammern	3,75	15
4-Kammern	1,85	15
8-Kammern	0,825	15

#### 4.5.2.11.6 Hybridisierung der cRNA

Für die Hybridisierung der Cyanine 3-markierten, linear amplifizierten cRNA wurden 8 • 15K Microarrays (Gasket slide, 8 HD Arrays/Slide, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D) verwendet. In der nachfolgend aufgeführten Tabelle 12 sind die Bestandteile, mit Volumina und Massen, für die Fragmentierung der Proben aufgelistet. Alle Bestandteile wurden pro Reaktion in ein 1,5 ml Nuklease-freies Reaktionsgefäß überführt und vorsichtig gevortext. Die Reaktionslösungen wurden für exakt 30 min bei 60° C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelagert. Den Proben wurden jeweils 25  $\mu\text{l}$  des 2x GEx-Hybridisierungspuffer HI-RPM (gebrauchsfertig, Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D) hinzugefügt und vorsichtig durch Invertieren durchmischt. Die Reaktionsgefäße wurden bei RT und 13.000 g für 60 s zentrifugiert und danach auf Eis gelagert. So schnell wie möglich wurden 40  $\mu\text{l}$  der Proben auf die einzelnen Gasket slides (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, D) appliziert, vorsichtig mit einem Microarray-Chip (mit der aktiven Seite nach unten zeigend) verschlossen und fest in eine Hybridisierungskammer eingespannt. Die beladene/n Hybridisierungskammer/n wurden bei 65° C für 17 h in einem Hybridisierungsöfen unter ständiger Rotation hybridisiert.

**Tabelle 12: Bestandteile, Volumina und Massen des Fragmentationsgemisches.**

Komponente	Volumen bzw. Masse für 8 x 15K Microarray
Cyanine 3-markierte, linear applifizierte cRNA	600 ng
10X Blocking Agent	5 $\mu\text{l}$
Nuklease-freies Wasser	ad. 24 $\mu\text{l}$
25X Fragmentierungspuffer	1 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	25 $\mu\text{l}$

#### 4.5.2.11.7 Waschen der Microarrays

Am Tag der Hybridisierung wurden die Genexpressionswaschpuffer 1 und 2 (GE-Waschpuffer) durch Zugabe von Triton X-102 (0,005 %) hergestellt. Der GE-Waschpuffer 2 wurde in eine sterile 1 l Glasflasche abgefüllt, fest verschlossen und über Nacht auf 37° C temperiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Microarrays entsprechend dem nachfolgenden Protokoll gewaschen. Vorbereitend auf die Waschung wurde eine vierteilige Waschstraße aufgebaut. Die einzelnen Bestandteile der Waschbäder und die entsprechenden Waschkonditionen sind in Tabelle 13 aufgelistet. Es wurden vier Färbekästen in der Nähe des Wasserbads mit dem GE-Waschpuffer 2 in einer Reihe angeordnet. Die Bäder 1, 2 und 4 wurden mit den jeweiligen Waschlösungen vollständig gefüllt. Auf elektrischen Rührplatten wurden die Waschbehälter 2-4 platziert und mit einem magnetischen Rührstab ausgestattet. Die Hybridisierungskammer/n wurde/n mit behandschuhten Fingern aus dem Hybridisierungsofen herausgenommen, auf einer flachen RNase-freien Oberfläche gelegt und auseinandergebaut. Die Microarray-Gasket slide Einheit wurde vorsichtig aus der Hybridisierungskammer entfernt, schnell in den Waschbehälter # 1 überführt und komplett im GE-Waschpuffer 1 eingetaucht. Von dem Barcodeende aus wurde die Microarray-Gasket slide-Einheit aufgebrochen und die beiden Objektträger voneinander separiert. Das Microarray wurde für die erste Waschung in einem Objektträgergestell platziert und in den Waschbehälter # 2 überführt. Unter stetigem Rühren wurde das Array für 1 min im GE Waschpuffer 1 gewaschen. Erst während dieser erste Waschung wurde Wasch- kammer 3 mit dem 37° C warmen GE-Waschpuffer 2 bestückt. Samt Objektträgergestell wurde das Microarray nach der angegebenen Waschzeit in die dritte Washkammer überführt und für 1 min mit dem GE Waschpuffer 2 gewaschen. Abschließend wurde das Objektträgergestell mit dem Array in Acetonitril getaucht.

**Tabelle 13: Bestandteile und Konditionen der Waschbäder für die hybridisierten Microarrays.**

Vorgang	Bad	Waschlösung	Temperatur	Zeit [min]
Auseinandernehmen des hybridisierten Micorarrays	1	GE-Waschpuffer 1	RT	
1. Waschung	2	GE-Waschpuffer 1	RT	1
2. Waschung	3	GE-Waschpuffer 2	37° C	1
3. Waschung	4	Acetonitril	RT	1



#### 4.5.2.11.8 Scannen der Microarrays und Extraktion der Daten

Nach dem Waschen wurden die Microarrays in einen Agilent-Objektträgerhalter eingelegt und mit einem DNA-Microarray-Scanner (Modell: G2505C, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) vermessen. Die gemessenen Signalintensitäten wurden mittels Agilent Feature Extraction Software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) extrahiert und mit Partek Genomic Suits (Partek Incorporated, Missouri, USA) weiter aufbereitet.

#### 4.5.2.12 Experimentelles Setup zur Bestimmung der Resistenzbildung durch wiederholte Exposition mit plasmabehandelter NaCl-Lösung

In der heutigen Zeit ist die Fähigkeit von Mikroorganismen, sich gegenüber schädlichen Einflüssen zu schützen und sog. Resistenzen auszubilden, ein großes Problem. Daher sollte mit einem speziell für die Plasmabehandlung entwickelten Versuchsablauf die Möglichkeit einer Resistenzbildung von *E. coli* gegenüber plasmabehandelte NaCl-Lösung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden 5 ml NaCl-Lösungen für entweder 1, 2, 3 oder 4 min ( $t_1$ ) mit einer DBE behandelt und direkt im Anschluss ( $t_2 = 0$  min) mit 100  $\mu$ l einer *E. coli*-Bakterienstammlösung beimpft. Die Einwirkzeit ( $t_3$ ) auf die Bakterien betrug hierbei 5 min. Danach wurden die Proben in Dezimalschritten in Verdünnungsflüssigkeit (VF) verdünnt. Mit der Verdünnung der Proben wurde auch die antiseptische Wirkung der plasmabehandelten NaCl-Lösung abgestoppt. Nach Anlegen der Verdünnungsreihe wurden 100  $\mu$ l Aliquote auf CASO-Agarplatten ausplattiert und bei einer Temperatur von 37° C über Nacht (16-18 h) im Brutschrank inkubiert. Danach wurde zunächst eine Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt (s. Abschnitt 4.5.2.8) und anhand dieser Daten der logarithmische Reduktionsfaktor (s. Abschnitt 4.5.2.9) für jede Plasmabehandlungszeit bestimmt. Für jede ausplattierte Verdünnungsstufe wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung in *E. coli* zu untersuchen wurden zwei der behandelten Bakterienkolonien in frische CASO-Boullion überführt und über Nacht rekultiviert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nur Bakterienkolonien verwendet wurden, die einer subletalen Plasmabehandlung, d.h. einer Behandlung, die zu einem Reduktionsfaktor von 3-4  $\log_{10}$  Stufen bei einer Ausgangskonzentration von  $10^6$ - $10^7$  KbE/ml führte, ausgesetzt waren. Die so gewonnene Übernachtskultur der rekultivierten plasmaexponierten Bakterien diente als Ausgangspunkt für den nächsten Untersuchungszyklus. Die nachfolgenden Zyklen 2-8 wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt und der Reduktionsfaktor für jede Plasmabehandlungszeit ermittelt. Für die Untersuchungszyklen 9 und 10 wurde die Einwirkzeit ( $t_3$ ) auf die Bakterien leicht variiert, ansonsten jedoch genau wie zuvor beschrieben verfahren.  $t_3$  betrug beim 9. Zyklus 10 min und beim 10. Zyklus 20 min.

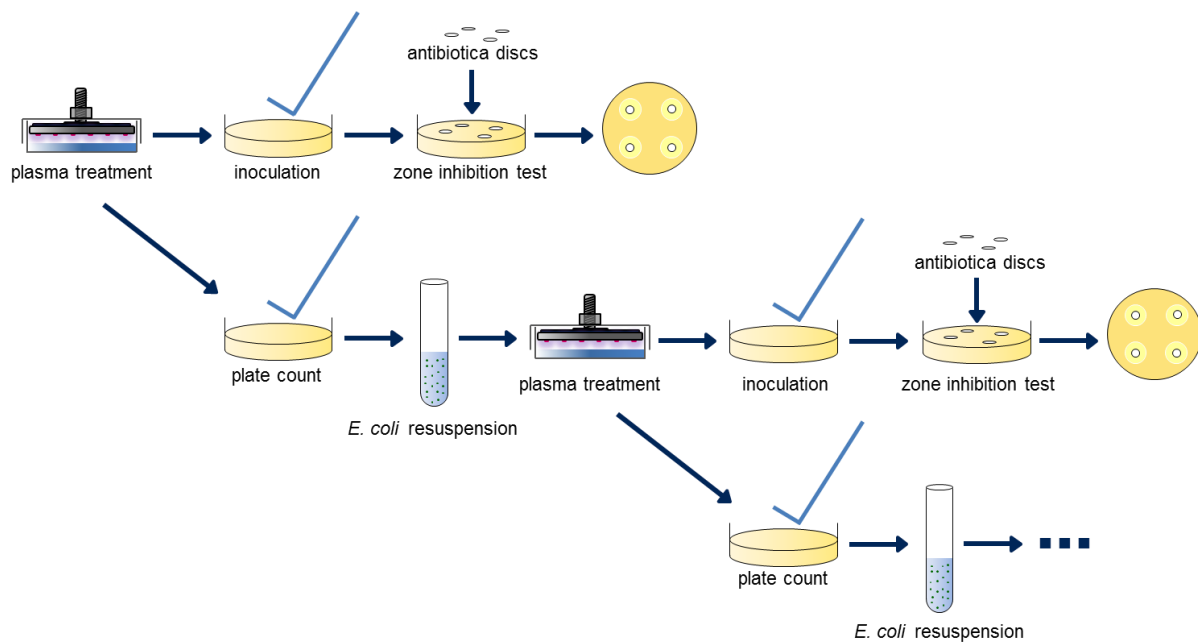
#### **4.5.2.13 Experimentelles Setup zur Bestimmung der Wechselwirkung mit Antibiotika**

Wie bereits angesprochen gilt Plasma als Induktor von sog. oxidativem Stress. Es übt diesen oxidativen Stress über ROS und RNS auf sowohl eukaryotische wie auch prokaryotische Zellen aus, was neben vielen anderen Effekten auch zu einem Wandel im Bakterienstoffwechsel und somit zu einer veränderten Sensitivität gegenüber handelsüblichen Antibiotika führen kann. Um eine potentiell mögliche Wechselbeziehung zwischen Antibiotikaeffekten und biologischen Plasmaeffekten zu untersuchen wurde in dieser Arbeit die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung angewendet. Dies ist ein Standardverfahren zur Prüfung von entstehenden Sensitivitätsänderungen einer Referenzkultur gegenüber keimspezifischen Antibiotika. Für die oben beschriebene direkte und indirekte Plasmabehandlung wurde die Vorgehensweise der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung angepasst und wird nachfolgend im Detail erläutert.

##### Direkte Plasmabehandlung:

Für die direkte Plasmabehandlung der Bakterien wurde eine frische Bakterienstammsuspension im Verhältnis 1:10 in 10 ml steriler NaCl-Lösung suspendiert. Ein Aliquot von 5 ml wurde in eine sterile Petrischale (d = 60 mm) überführt und für 3 min mit Plasma behandelt. Der Rest der verdünnten Bakterienstammsuspension diente bei den Versuchen als unbehandelte Kontrolle. Die Betriebsdauer der verwendeten DBE entsprach hierbei einer nicht letalen Behandlungszeit, um plasmaexponierte und lebende Bakterien zu erhalten. Nach erfolgter Plasmaexposition wurden Mueller-Hinton-Agarplatten mit der Probensuspension inokuliert. Hierzu wurde ein steriles Wattestäbchen in die Suspension getaucht. Um evtl. überschüssiges Suspensionsmittel zu entfernen, wurde das Wattestäbchen vorsichtig mit leichtem Druck am oberen Rand des Reaktionsgefäßes gedreht. Das so kontaminierte Wattestäbchen wurde in engen Zick-Zack-Bewegungen dreimal über eine Mueller-Hinton-Agar-Platte gestrichen. Hierbei wurde zwischen den Inokulationsschritten die Agarplatte in einem Winkel von 60° gedreht. Dieser Vorgang sollte zu einer möglichst homogenen Verteilung der Mikroorganismen auf der Oberfläche beitragen. Nach dem Beimpfen erfolgte ein Trocknungsschritt, indem die Agarplatte offen für 3-5 min zum Trocknen in einer sterilen Werkbank gelagert wurde. Im Anschluss an diese Trocknungsphase wurden mit unterschiedlichen Antibiotika getränkte Plättchen (s. Tabelle 7) mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Applikators (8-fach, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D) auf die Agaroberfläche aufgebracht und bei einer Temperatur von 37° C im Brutschrank für 16-18 h inkubiert. In gleicher Weise wurde auch mit der unbehandelten Kontrolle verfahren.

Für die Bestimmung der Wechselwirkung von Antibiotika nach mehrfacher Exposition von Plasma auf eine Bakteriensuspension wurden 100 µl der behandelten Bakteriensuspension in 50 ml CASO-Boullion überführt und bei 37° C für 16-18 h über Nacht rekultiviert. Aus dieser rekultivierten Übernachtskultur wurde für den nachfolgenden Versuch die Bakterienstammlösung gewonnen und wie oben beschrieben aufbereitet, plasmabehandelt und mit Hilfe des antimikrobiellen Empfindlichkeitstests untersucht. In Abbildung 32 ist der schematische Ablauf des Versuches zusammengefasst.



**Abbildung 32: Schematische Darstellung der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung.**

#### Indirekte Plasmabehandlung:

Für die indirekte Plasmabehandlung der Bakterien wurde eine frische Bakterienstammkultur im Verhältnis 1:10 in 10 ml steriler NaCl-Lösung suspendiert. 5 ml NaCl-Lösung wurden in eine sterile Petrischale (d = 60 mm) überführt und für 1,5 min mit der verwendeten DBE behandelt. Im Anschluss wurden 100 µl der verdünnten Bakterienstammlösung in die plasmabehandelte NaCl-Lösung überführt und eine Einwirkzeit von 15 min abgewartet. Der Rest der verdünnten Bakterienstammkultur diente bei den Versuchen als unbehandelte Kontrolle. Analog zur Behandlung mit plasmabehandelter NaCl-Lösung wurden 100 µl der verdünnten Bakterienstammlösung in unbehandelte NaCl-Lösung überführt. Die Betriebsdauer der verwendeten DBE sowie die Einwirkzeit entsprachen hierbei nicht letalen Zeiten, um plasmaexponierte und lebende Bakterien zu erhalten. Nach erfolgter Exposition mit plasmabehandelter NaCl-Lösung wurden Mueller-Hinton-Agarplatten mit der Probensuspension inokuliert. Hierzu wurde ein steriles Wattestäbchen in die Suspension getaucht. Um evtl. überschüssiges

Suspensionsmittel zu entfernen wurde das Wattestäbchen vorsichtig mit leichtem Druck am oberen Rand des Reaktionsgefäßes gedreht. Das so kontaminierte Wattestäbchen wurde in engen Zick-Zack-Bewegungen dreimal über eine Mueller-Hinton-Agar-Platte gestrichen. Hierbei wurde zwischen den Inokulationsschritten die Agarplatte in einem Winkel von 60° gedreht. Dieser Vorgang sollte zu einer möglichst homogenen Verteilung der Mikroorganismen auf der Oberfläche beitragen. Nach dem Beimpfen erfolgte ein Trocknungsschritt, indem die Agarplatte offen für 3-5 min zum Trocknen in einer sterilen Werkbank gelagert wurde. Im Anschluss an diese Trocknungsphase wurden mit unterschiedlichen Antibiotika getränkte Plättchen (s. Tabelle 7) mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Applikators (8-fach, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D) auf die Agaroberfläche aufgebracht und bei einer Temperatur von 37° C im Brutschrank für 16-18 h inkubiert. In gleicher Weise wurde auch mit der unbehandelten Kontrolle verfahren.

Für die Bestimmung der Wechselwirkung von Antibiotika nach mehrfacher Exposition von plasmabehandelter NaCl-Lösung auf eine Bakteriensuspension wurden 100 µl der behandelten Bakteriensuspension in 50 ml CASO-Boullion überführt und bei 37° C für 16-18 h über Nacht rekultiviert. Aus dieser rekultivierten Übernachtskultur wurde für den nachfolgenden Versuch die Bakterienstammlösung gewonnen und wie oben beschrieben aufbereitet, plasmabehandelt und mit Hilfe des antimikrobiellen Empfindlichkeitstests untersucht.

### **4.5.2.14 Experimentelles Setup zur Prüfung der Säureempfindlichkeit von *E. coli***

Mit Hilfe eines plasmaunabhängigen Versuchsmodells sollte geprüft werden welchen Einfluss ein niedriger pH-Wert (von 2,6) auf die Vitalität von *E. coli* hat. Zudem sollte damit getestet werden, inwieweit die antimikrobiellen Effekte einer direkten und indirekten CAP-Behandlung auf pH-Effekte zurückgeführt werden können.

Zur Prüfung der Säureempfindlichkeit von *E. coli* wurden zwei sterile 0,85 %ige NaCl-Lösungen mit einem pH-Wert von 2,6 hergestellt. Wobei der pH-Wert entweder mit 0,1 molarer HCl oder 0,1 molarer HNO<sub>3</sub> auf 2,6 eingestellt wurde. Für die Säurebehandlung der Bakterien wurden 4,9 ml Aliquote der beiden sauren NaCl-Lösungen in sterile Petrischale (d = 60 mm) überführt und mit 100 µL Aliquoten einer frischen Bakterienstammsuspension beimpft, so dass eine Bakterienkonzentration von 10<sup>7</sup> KBE/ml in den sauren NaCl-Lösungen erzielt wurde. Die Einwirkzeit auf die Bakterien betrug hierbei 15, 30 und 60 min. Danach wurden die Proben in Dezimalschritten in Verdünnungsflüssigkeit (VF) verdünnt. Mit der Verdünnung der Proben wurde der pH-Wert der NaCl-Lösung wieder angehoben und die Säure neutralisiert. Nach

Anlegen der Verdünnungsreihe wurden 100 µl Aliquote auf CASO-Agarplatten ausplattiert und bei einer Temperatur von 37° C über Nacht (16-18 h) im Brutschrank inkubiert. Danach wurde eine Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt.

#### **4.6 Statistik und grafische Darstellung**

Die grafische Darstellung von Daten erfolgte anhand von Punktdiagrammen, halblogarithmischen Liniendiagrammen und Balkendiagrammen. Die deskriptive Darstellung von Daten erfolgte anhand von Mittelwerten und Standardabweichungen. Gegebenenfalls wurden anstatt Standardabweichungen Minima und Maxima (z.B. in Grafiken die Inaktivierungskurven darstellen) angegeben, um die Gesamtvariabilität der Daten zu verdeutlichen. Dies erfolgte aufgrund der halblogarithmischen Auftragung der Daten in Form von Liniendiagrammen. Standardabweichungen können bei dieser Art der Auftragung nur in eine Richtung plausibel aufgetragen.

Um Unterschiede in den Intensitäten der hybridisierten, Cyanine 3-markierten und linear amplifizierten cRNA (abhängige Variable) zwischen unbehandelten und a) direkt plasmabehandelten oder b) indirekt plasmabehandelten NaCl-Lösungen (Faktor/unabhängige Variable) zu untersuchen, wurden Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Die Ergebnisdarstellung erfolgte in Form von F-Tests und zugehörigen p-Werten. Bei einem p-Wert von <5% wurde statistische Signifikanz angenommen.

Alle statistischen Analysen wurden mit Origin Pro 2016 (OriginLab, Northampton, USA), Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, Redmond, USA) und Partek Genomics Suits (Partek Incorporated, Missouri, USA) durchgeführt.

### **5 Ergebnisse und Diskussion**

Um Plasmaeffekte aus unterschiedlichen Blickwinkeln zu betrachten und zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem argonbetriebenen Plasmajet (kINPen09) und zwei dielektrisch behinderten Oberflächenentladungen (DBE) gearbeitet. Die Wirkungsweise der DBE hat sich in den vergangenen Jahren als geeignet für Untersuchungen an den einzelnen Phasen (Plasma, Gas und Flüssigkeit) der beobachteten komplexen Reaktionskaskade sowie den Nachweis von biologischen Plasmaeffekten herausgestellt<sup>(27, 28, 54)</sup>. Daher fokussierte sich die vorliegende Arbeit zum größten Teil auf diese Plasmaanlagen.

In diesem dritten Kapitel sollen nun die gewonnenen elektrotechnischen, physikalischen, chemischen sowie biologischen Ergebnisse im Wesentlichen dargestellt und diskutiert werden. Um den Umfang und die Ergebnisse der sehr unterschiedlichen Versuchsansätze in einer

transparenten und verständlichen Weise darzustellen und zu diskutieren, wurde dieser Teil der Arbeit in die folgenden Themenkomplexe unterteilt:

- 3.1 Vergleich der dielektrisch behinderten Oberflächenentladungen
- 3.2 Einfluss des ROS/RNS-Gehaltes auf die antimikrobiellen Effekte eines Plasmajets
- 3.3 Betrachtungen zur atmosphärendruckplasmainduzierten Flüssigkeitschemie innerhalb wässriger Lösungen
- 3.4 Ausführungen zu den biologischen Wirkmechanismen plasmaassoziierten chemischer Moleküle
- 3.5 Plasmabasierte Herstellung, Stabilisierung und Optimierung von antimikrobiell wirksamen Flüssigkeiten
- 3.6 Microarraybasierte Genexpressionsanalyse
- 3.7 Anwendung CAP-behandelter antimikrobiell wirksamer Lösungen

### **5.1 Vergleich der dielektrisch behinderten Oberflächenentladungen**

Eine neue, auf Keramik basierende DBE (s. Abbildung 9) mit einer durch das Material bedingten höheren Lebensdauer sowie verbesserten Entladungsstabilität wurde mit einer etablierten epoxidharzbasierten DBE (Bezugssystem) verglichen, welche sich in vorangegangenen Studien von Oehmigen *et al.*<sup>(27, 28, 54)</sup> als besonders geeignet für die Untersuchungen an den einzelnen Phasen "Plasma, Gas und Flüssigkeit" gezeigt hat. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit sich Veränderungen an technischen Details, wie z.B. das verwendete Material und die elektrischen Ansteuerungsparameter, auf die Plasmaeigenschaften, die chemische Zusammensetzung der flüssigen Phase sowie die biologische Wirksamkeit auswirken. Aufgrund des identischen geometrischen Aufbaus der beiden DBE folgen beide Anlagen derselben Reaktionskaskade (Plasma → Gas → Flüssigkeit → Zelle) und ermöglichen somit vergleichende Untersuchungen auf fast allen Ebenen. Die keramikbasierte DBE wurde, analog zum epoxidharzbasierten Bezugssystem, mit Hilfe einer Vielzahl von Analysemethoden systematisch bis hin zur biologischen Leistung untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse werden nachfolgend dargestellt und diskutiert. Der offensichtlichste Unterschied zwischen den beiden DBE liegt in der Verwendung von unterschiedlichen Materialien für das Elektrodensystem. Die Verwendung anderer Materialien führte dazu, dass für die Ansteuerung der neuen keramikbasierten DBE andere, vom Bezugssystem abweichende Betriebsparameter benötigt wurden. Die nachfolgende Tabelle 14 fasst die unterschiedlichen Materialien und Betriebsbedingungen der beiden Plasmaanlagen zusammen.

**Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung der Materialien und elektrischen Betriebsparameter von epoxidharz- und keramikbasierter DBE<sup>(69)</sup>.**

<b>Parameter</b>	<b>Epoxidharz-DBE</b>	<b>Keramik-DBE</b>
Material Dielektrikum	Geätzte FF4 Leiterplatte	Aluminiumoxid (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
Elektrodenmaterial	Kupfer	Silber/Platin Konduktorpaste (Heraeus: C 1076 SD [LPA 609-022])
Dielektrische Schutzschicht	Plastik 70 Acryllack (CRC Industries GmbH, Deutschland)	REACH compliant multilayer dielectric (Heraeus: IP 9117E)
Arbeitsgas	Umgebungsluft mit einer Gasflussrate von 0,5 slm	Umgebungsluft mit einer Gasflussrate von 0,5-1 slm
<b>Elektrische Parameter</b>		
• Spannung(Spitze-Spitze) (kV)	10-13	15-18
• Frequenz (kHz)	20	6
• Leistung pro An-Phase (W)	12	14
• Leistung pro Periode (W)	1,2 /10 ms Puls; 0,3 /1,6 s Periode	1,4 /1 s Periode
• Energieeinspeisung in 16 s (J)*	4,8	22,4
<b>Temperatur (°C)</b>		
• Gasphase	30	49
• Flüssigkeit	≤ 37	≤ 37

\* Da die Dauer der Periode der beiden DBE unterschiedlich lang ist, wurde die Energieeinspeisung nach 16 s bestimmt. Dies entspricht dem kleinsten gemeinsamen Vielfachen und ermöglichte den direkten Vergleich zwischen den DBE.

Ausgangspunkt der systematischen Analyse der beiden in Umgebungsluft betriebenen Entladungen war die Plasmaphase. Bei den hier untersuchten DBE wird das Plasma durch Anlegen einer Hochspannung zwischen zwei Elektroden, welche durch ein Dielektrikum voneinander getrennt sind, erzeugt. Die elektrische Energie, die in den entsprechenden elektrischen Feldern vorhanden ist, wird in das Plasma transferiert, indem freie Elektronen beschleunigt werden. Diese freien Elektronen können wiederum ihre gespeicherte Energie durch Ionisation, Anregung oder Dissoziation von Molekülen auf schwere neutrale Teilchen übertragen<sup>(96)</sup>. Wenn Atome oder Moleküle durch Energietransfer auf ein höheres Energieniveau angehoben werden, sind diese bestrebt, durch Energieabgabe wieder auf den stabileren Grundzustand zurückzukehren. Hierbei wird diese Energie in Form von Wärme, Kollision(en) oder elektromagnetischer Strahlung an die Umgebung bzw. vorhandene Moleküle abgegeben. Letzteres resultiert bei beiden DBE in einer schon vom Auge wahrnehmbaren violett blauen Lichterscheinung (s.

Abbildung 4 und Abbildung 9). Mit Hilfe der optischen Emissionsspektroskopie kann diese emittierte Strahlung spektral aufgelöst und die Intensitäten können entsprechenden Wellenlängen zugeordnet werden. Üblicherweise wird der Wellenlängenbereich von 200 bis 1100 nm betrachtet. Die gemessenen Intensitäten bei bestimmten Wellenlängen lassen sich wiederum spezifisch angeregten Atomen bzw. Molekülen zuordnen. Die OES ist ein passives optisches Verfahren, das zur ersten Identifizierung von angeregten reaktiven Plasmaspezies angewendet wurde. Da beide DBE in atmosphärischer Luft betrieben werden, stehen den freien Elektronen für einen Energietransfer eine Vielzahl von Atomen und Molekülen zur Verfügung. Atmosphärische Luft besteht hauptsächlich aus  $N_2$  (ca. 78 %),  $O_2$  (ca. 20 %) und  $Ar_2$  (ca. 1%)<sup>(97)</sup>. Es wurde daher angenommen, dass die freien Elektronen hauptsächlich auf diese Moleküle übertragen und spezifische Signale im optischen Emissionsspektrum detektiert werden.

Abbildung 33a und Abbildung 33b zeigen typische optische Emissionsspektren der epoxidharzbasierten und keramikbasierten DBE im UV/VIS- und NIR-Spektralbereich. Beide Spektren sehen nahezu identisch aus, wobei kleine Unterschiede in den gemessenen Intensitäten beobachtet werden können, die auf eine höhere bzw. niedrigere Anzahl der jeweiligen Moleküle zurückgeführt werden können. Beide Spektren weisen jedoch die typischen Emissionsbanden des Zweiten Positiven (296,22 nm; 315,90 nm; 337,13 nm; 357,69 nm; 380,49 nm) und Ersten Negativen Systems (391,44 nm) des angeregten  $N_2$ -Moleküls auf. Trotz der feuchten Umgebung und der fast 4,6-fachen höheren Energieeinspeisung bei der keramikbasierten DBE wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 308$  nm für beide Entladungen keine Emission für den A-X-Übergang des Hydroxylradikals ( $OH^\bullet$ ) detektiert. An dieser Stelle sei kurz erklärt, dass elektronische Übergänge üblicherweise durch die Schreibweise wie z.B. A-X gekennzeichnet werden, wobei hier X für den Grundzustand und A für den ersten elektronisch angeregten Zustand steht.

Die bereits erwähnte fehlende Emission für das Hydroxylradikal bei  $\lambda = 308$  nm geht mit den veröffentlichten Arbeiten von Oehmigen *et al.*<sup>(28)</sup> und Eto *et al.*<sup>(98)</sup> konform, die ebenfalls DBE-generiertes Plasma in feuchter Umgebungsluft untersucht haben. Üblicherweise werden  $OH^\bullet$ -Emissionen (A-X-Übergänge) nur beobachtet, wenn Helium (He) oder Argon (Ar) Gasbestandteile des Plasmas sind<sup>(30, 45)</sup>. Im vorliegenden Fall wurden durch die verwendeten DBE-Luftplasmen nicht genügend  $OH^\bullet$ -Radikale im angeregten Zustand (A) generiert und somit auch keine nachweislichen  $OH^\bullet$ -Emissionen detektiert. Da der Entstehungsprozess von reaktiven Spezies und die Plasmakinetik das Emissionsspektrum maßgeblich beeinflussen, bedeutet die nachweislich fehlende  $OH(A-X)$ -Emission jedoch nicht, dass  $OH^\bullet$ -Radikale im Plasma wirklich abwesend sind. Für eine weiterführende und tiefgründigere Diskussion müssen sowohl die



Frequenz, mit der OH(A)-angeregte Moleküle durch z. B. Rekombination, direkte Anregung und Metastabile gebildet werden, als auch das sog. Quenching in Betracht gezogen werden.

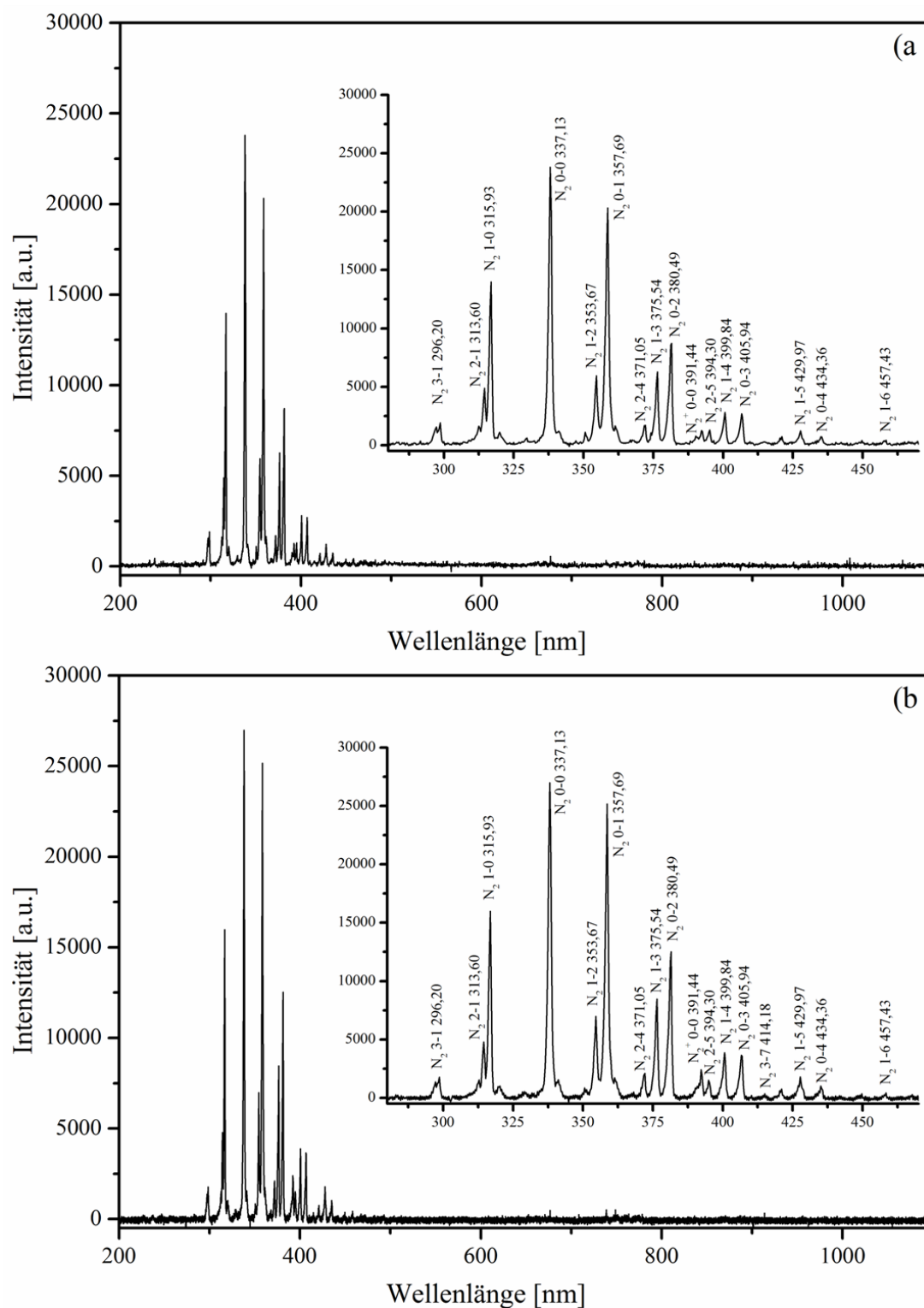


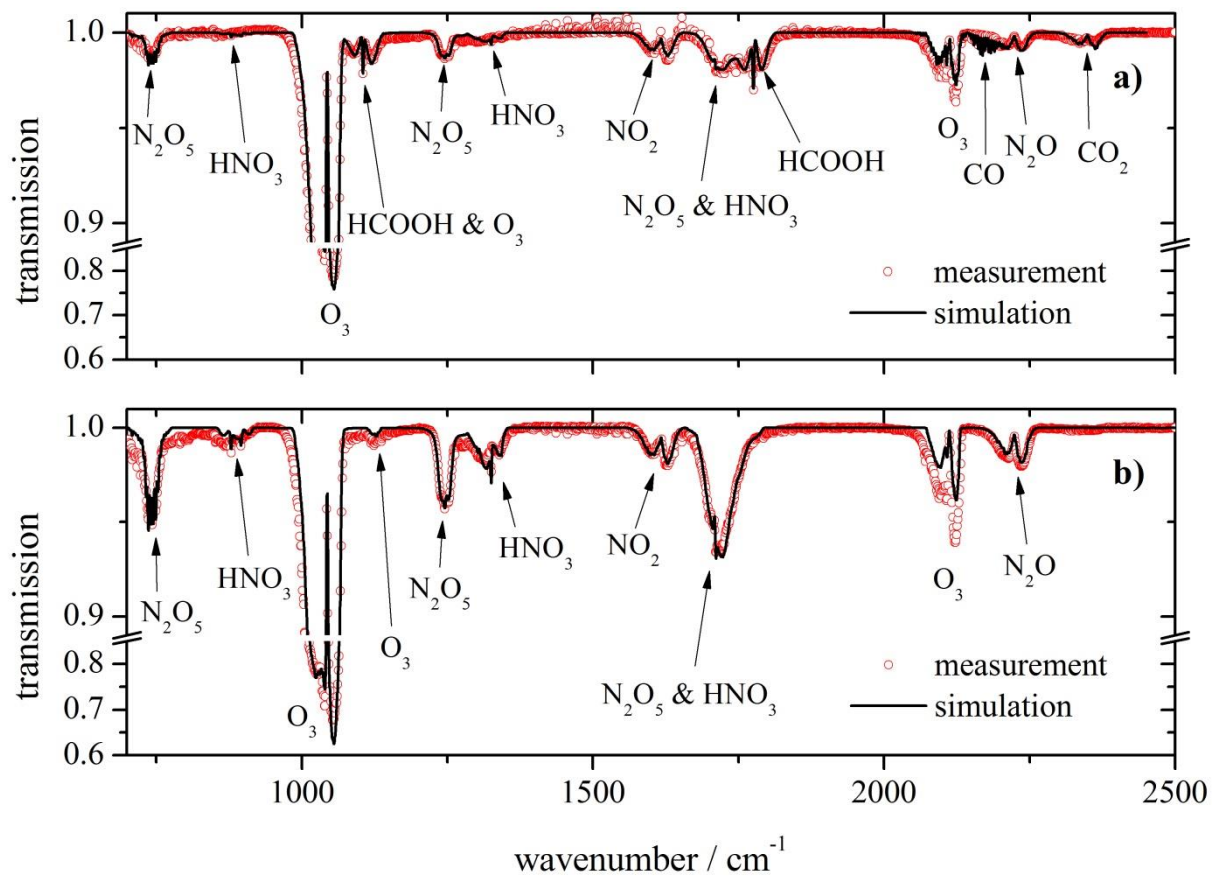
Abbildung 33: In Luft, oberhalb einer mit 5 ml NaCl-Lösung gefüllten Petrischale, aufgenommene optische Emissionsspektren von epoxidharzbasierter DBE (a) und keramikbasierter DBE (b)<sup>(69)</sup>.

Beide Aspekte sind sehr stark von der Gaszusammensetzung, der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit abhängig. Allerdings waren Untersuchungen, die diese Aspekte berücksichtigen, nicht Teil des systematischen Vergleiches der beiden DBE. Die optische Emissionsspektroskopie diente hierbei lediglich zur Identifizierung von abundant angeregten Spezies und der Detektion von möglichen drastischen Unterschieden im Emissionsspektrum -welche aber nicht nachgewiesen werden konnten.

Anschließend sollten mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie weitere im Neutralzustand vorliegende reaktive Spezies in der Gasphase identifiziert werden. Dazu wurde der im Abschnitt 4.3.2 beschriebene experimentelle Aufbau verwendet. Abbildung 15 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanordnung. Die DBE waren hierfür in einer speziellen, abgeschlossenen Kammer integriert die über einen Gaseinlass und Gasauslass verfügte. Über den Einlass wurde ein definierter Luftstrom in die Kammer eingeleitet, das Plasma gezündet und der plasmabehandelte Luftstrom über ein Nadelventil in die Langwegzelle eines FTIR-Spektrometers abgeleitet. Die Identifizierung der unterschiedlichen Spezies in der Gasphase erfolgte unter Verwendung der Hitran Database<sup>(73)</sup> in Kombination mit dem Simulations- und Fitprogramm QMACSoft HT der Firma neoplas control GmbH Greifswald. In Abbildung 34 sind die aufgezeichneten Transmissionsspektren der epoxidharzbasierten und keramikbasierten DBE, welche beim Betreiben über einer leeren Petrischale (d.h. an trockener Luft) erhalten wurden, sowie die Transmissionsspektren, welche mit Hilfe des Simulations- und Fitprogramm QMACSoft HT der Firma neoplas control GmbH simulierten wurden, wiedergegeben. Die Konzentrationen der identifizierten Moleküle wurden durch Anpassung der theoretischen Absorptionssignale an die Messsignale bestimmt. Sie sind in Tabelle 15 zusammengefasst wiedergegeben. Im Unterschied zu den oben beschriebenen OES-Messungen können in den beiden Transmissionsspektren der DBE durchaus deutliche Unterschiede beobachtet werden. Der Vergleich der aufgezeichneten Spektren mit der Hitran-Database<sup>(73)</sup> hat gezeigt, dass Ozon ( $O_3$ ), Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ), Distickstoffmonoxid ( $N_2O$ ), Salpetersäure ( $HNO_3$ ) und Distickstoffpentoxid ( $N_2O_5$ ) durch beide DBE erzeugt werden. Durch eine Quantifizierung der Moleküle mit Hilfe der FTIR-spektroskopischen Analyse konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die keramikbasierte DBE in der Regel höhere Konzentrationen der besagten Spezies produziert. Diese Tatsache kann (ebenfalls) auf die 4,6-fach höhere Leistungseinspeisung zurückgeführt werden.

Neben Ozon und den Stickstoffverbindungen konnten die Kohlenstoffverbindungen Kohlenstoffmonoxid ( $CO$ ), Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) und Ameisensäure ( $HCOOH$ ) ausschließlich in der Gasphase der epoxidharzbasierten DBE nachgewiesen und quantifiziert werden. Diese Verbindungen könnten möglicherweise ihren Ursprung aus dem  $CO_2$  (390 ppm) der komprimierten

Umgebungsluft haben. Da jedoch zum Betreiben beider DBE die gleiche komprimierte Umgebungsluft verwendet wurde, müssten in diesem Fall die entsprechenden FTIR-Spektren die



**Abbildung 34:** FTIR-Transmissionsspektren des Abgases der epoxidharzbasierten DBE (a) und keramikbasierten DBE (b), welche mit komprimierter Luft bei einer Gasflussrate von 1 slm oberhalb einer leeren Petrischale betrieben wurden. Ebenfalls dargestellt sind die Spektren, die zur Identifizierung der Spezies mit dem QMACSoft HT Simulations- und Fitprogramm erhaltenen wurden<sup>(69)</sup>.

gleichen kohlenstoffhaltigen Spezies aufweisen. In einer vorangegangenen Studie haben Oehmigen *et al.*<sup>(28, 29)</sup> diesen Sachverhalt ebenfalls beobachtet und diskutiert. Sie stellten dabei die Hypothese auf, dass das detektierte CO<sub>2</sub> in ihren Messungen auf den plasmainduzierten Zerfall des protektiven Plastik-70-Lacks zurückzuführen sein könnte. Unter den besonderen Bedingungen einer Oberflächenentladung (z.B. energetische Elektronen, Ionen, andere reaktive Spezies, Entladungstemperaturen ect.) können Bestandteile aus dem Plastik-70-Lack herausgelöst und in die Gasphase überführt werden. Die in dieser Studie erhaltenen FTIR-Spektren untermauern diese Hypothese.

Neben den wesentlichen Unterschieden zwischen epoxidharzbasierter und keramikbasierter DBE in den FTIR-Messungen zeigt Tabelle 15 zusätzlich für die keramikbasierte DBE die Konzentrationen der verschiedenen Spezies bei unterschiedlichen Gasflussraten. Untersuchungen des Einflusses von unterschiedlichen Gasflussraten auf die Entstehung und Konzentration

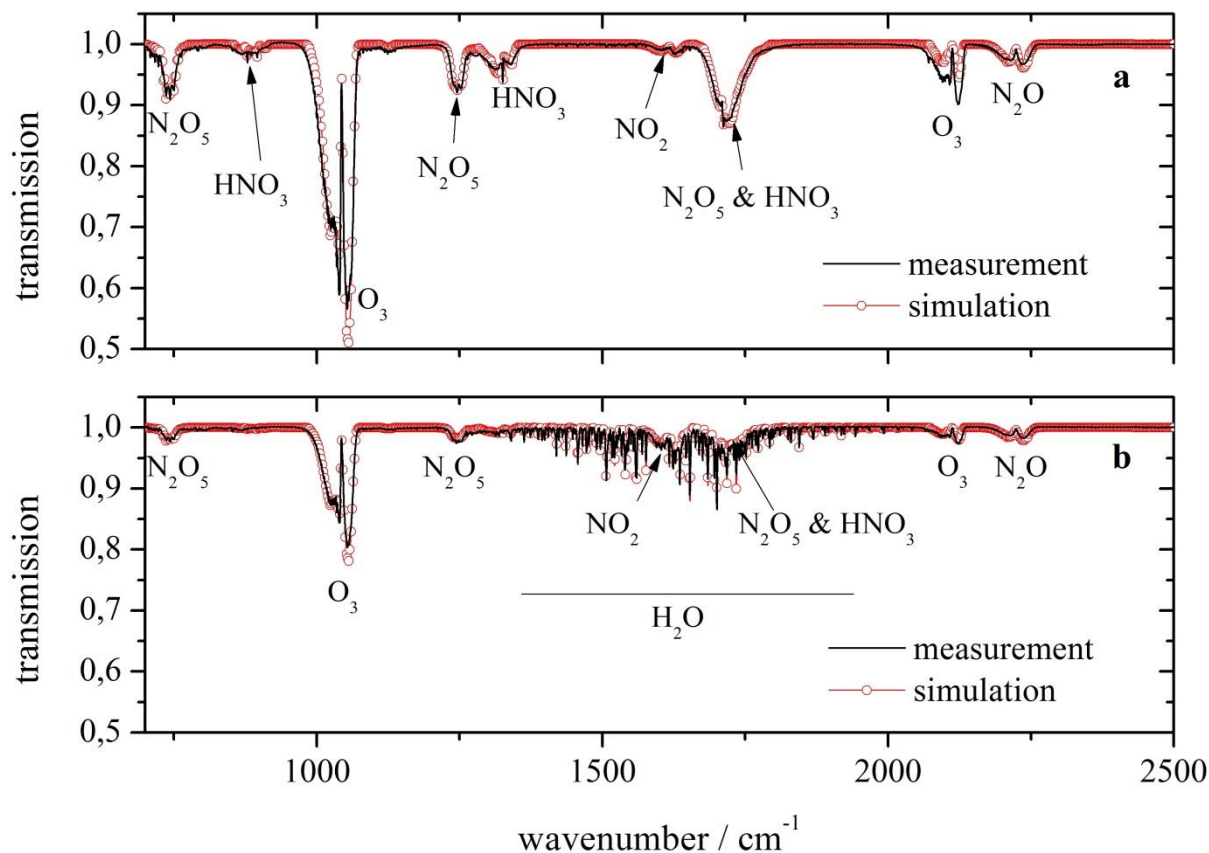
von reaktiven Spezies wurden experimentell nur mit dem neuen keramikbasierten System realisiert. Wenn dessen Gasflussrate von 1,0 slm auf 0,5 slm herabgesetzt wurde, stiegen mit Ausnahme von  $\text{NO}_2$  alle Konzentrationen der nachgewiesenen Spezies an. Diese Ergebnisse sind ohne ein chemisches Modell sehr schwer zu interpretieren. Trotzdem kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass ein schnellerer Abtransport und eine stärkere Verdünnung der reaktiven Spezies mit einer größeren Gasflussrate einhergeht und die komplexen konzentrationsabhängigen chemischen Reaktionen eine signifikante Rolle in diesen Prozessen spielen.

**Tabelle 15: Durch FTIR-spektroskopische Analyse detektierte Moleküle innerhalb der Plasmagasphase mit entsprechenden Konzentrationen bei unterschiedlichen Gasflussraten, mit denen die keramikbasierte bzw. epoxidharzbasierte DBE betrieben wurden<sup>(69)</sup>.**

Spezies	Keramik DBE [ppm]			Epoxidharz DBE [ppm]
	0,5 slm	0,5 slm / 5,0 ml $\text{H}_2\text{O}$	1,0 slm	1,0 slm
Ozone ( $\text{O}_3$ )	442,0	159,0	304,0	177,0
Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2$ )	2,7	6,2	3,5	2,2
Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ )	7,4	4,0	3,4	1,7
Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ )	14,5	2,2	6,4	1,3
Distickstoffpentoxid ( $\text{N}_2\text{O}_5$ )	12,2	2,8	6,6	2,1
Ameisensäure ( $\text{HCOOH}$ )	–	–	–	4,7
Kohlenstoffmonoxid ( $\text{CO}$ )	–	–	–	11,7
Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ )	–	–	–	0,8
Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ )	–	164,0	–	–

Um möglichst zur Plasmabehandlung von Flüssigkeiten/Zellsuspensionen analoge Versuchsbedingungen zu generieren, wurden zusätzliche FTIR-spektroskopische Untersuchungen unter sehr feuchten Bedingungen mit der keramikbasierten DBE durchgeführt. Hierfür wurde das Plasma in direkter Nachbarschaft zu einer Flüssigkeitsoberfläche ( $\text{H}_2\text{O}$ ;  $V = 5 \text{ ml}$ ) gezündet, das entstehende Gas abgeleitet und die detektierten Spezies identifiziert und quantifiziert. Die

entsprechenden Konzentrationen der gefundenen Moleküle sind ebenfalls in Tabelle 15 wiedergegeben, während die aufgezeichneten FTIR-Spektren in Abbildung 35 dargestellt sind.



**Abbildung 35:** FTIR-Transmissionsspektren des abgeleiteten Gases der keramikbasierten DBE, welche unter trockenen (a) und sehr feuchten (b) Betriebsbedingungen bei einer Gasflussrate von 0,5 slm, aufgezeichnet wurden. Ebenfalls dargestellt sind die Spektren, die zur Identifizierung der Spezies mit dem QMACSoft HT Simulations- und Fitprogramm erhaltenen wurden.

Im spektralen Bereich von 1330 und 1980  $\text{cm}^{-1}$  sind unter den sehr feuchten Versuchsbedingungen intensive Absorptionsbanden des Wassers nachweisbar. Da in diesem Fall besondere Sorgfalt bei der Bestimmung des Hintergrundsignales aufgewendet wurde, müssen die erhaltenen Wassersignale eine direkte Folge der Plasmaeinwirkung und des plasmainduzierten Temperaturanstieges in der Flüssigkeit sein. Daraus folgt, dass während der Plasma-ON-Phase die Anzahl an Wassermolekülen im Gas höher ist als für die Hintergrundmessung. Die ermittelte Wasserkonzentration in den durchgeführten Versuchen betrug 164 ppm. Zusätzlich zu den Wassermolekülen konnten alle Spezies detektiert werden, die ebenfalls erzeugt werden, wenn die keramikbasierte DBE in einer leeren Petrischale mit trockenem Arbeitsgas (Luft) gezündet wird. Jedoch sind für die einzelnen Verbindungen abweichende Konzentrationen ermittelt worden. Mit Ausnahme von  $\text{NO}_2$  waren die Verbindungen  $\text{O}_3$  (159 ppm),  $\text{N}_2\text{O}$  (4,0 ppm),  $\text{N}_2\text{O}_5$  (2,8 ppm) und  $\text{HNO}_3$  (2,2 ppm) in signifikant geringeren Mengen im sehr feuchten Abgas

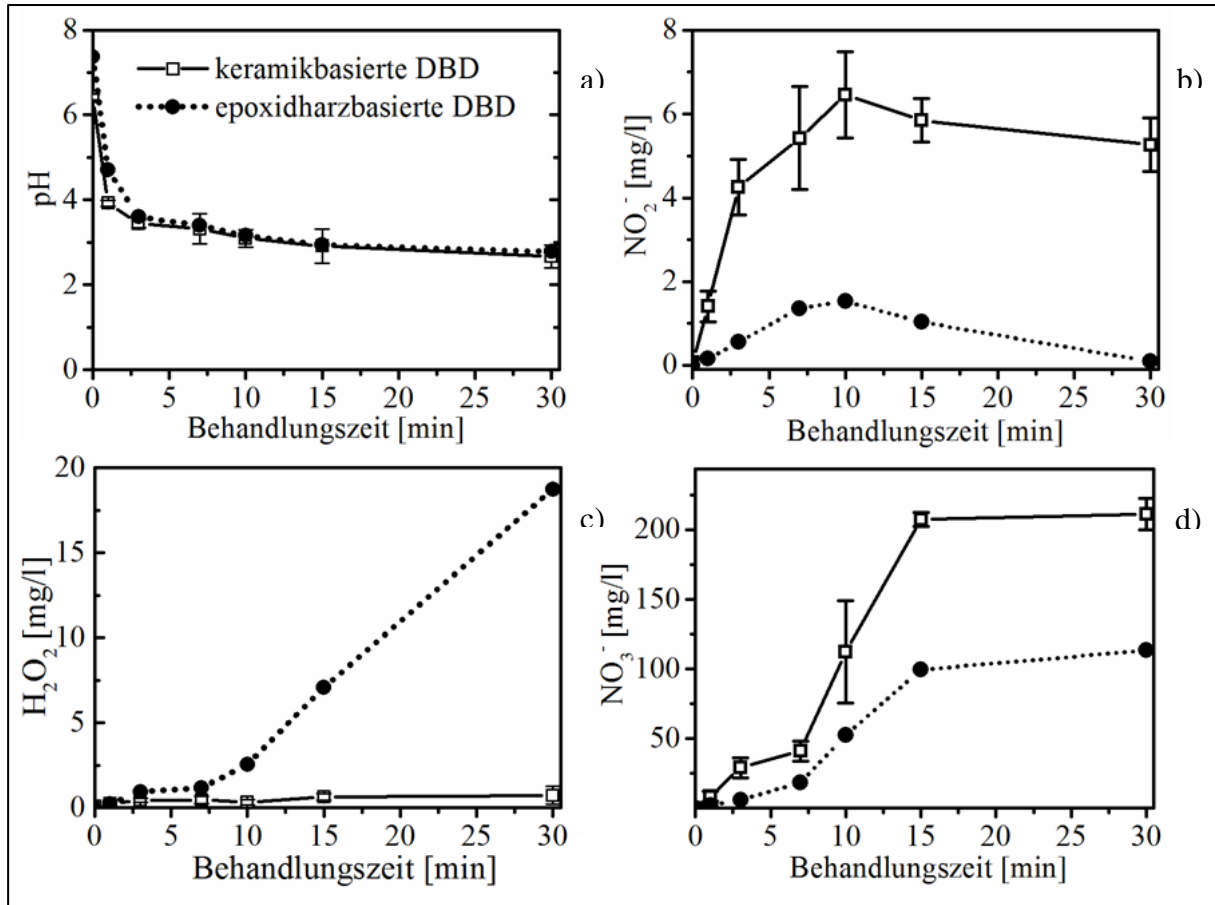
anwesend. Dies begründet sich in der hohen Konzentration an Wassermolekülen in der Gasphase und der benachbarten Flüssigkeit, die einerseits die Plasmachemie stark beeinträchtigt und andererseits die Löslichkeit der reaktiven Spezies innerhalb der flüssigen Phase begünstigt<sup>(45, 99)</sup>.

Mit Hilfe der OES- und FTIR-Messungen konnten bereits eine Vielzahl von reaktiven Spezies in der Plasma-/Gas-Phase identifiziert und erste Hinweise für die Diffusion dieser Moleküle in die benachbarte Flüssigkeit gefunden werden. Um dies zu belegen und evtl. weitere reaktive Spezies, die sich durch Reaktionen in der Flüssigkeit bilden, zu identifizieren, wurde eine nass-chemische Analyse an den plasmabehandelten Flüssigkeiten durchgeführt.

Die in der Plasma-/Gas-Phase gefundene Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) ist eine starke Säure, die in wässrigen Medien gut löslich ist und vollständig dissoziiert vorliegt<sup>(34, 100, 101)</sup>. Folglich konnte in den anschließenden Wasseranalysen eine zeitabhängige Ansäuerung und zunehmende Konzentration an Nitrationen beobachtet werden. Ähnlich wie in vorangegangenen Studien wurden neben der pH-Änderung und Nitratanreicherung auch eine ansteigende Anzahl an Nitriten und Wasserstoffperoxidmolekülen im plasmabehandelten Wasser nachgewiesen.<sup>(28, 34, 54, 102, 103)</sup>

In Abbildung 36 sind die chemischen Veränderungen in destilliertem Wasser nach Einwirken von epoxidharzbasierter oder keramikbasierter DBE auf die jeweiligen Proben zusammengefasst dargestellt. Die Ergebnisse der Flüssigkeitsanalyse zeigen deutlich, dass die Behandlung von Wasser mit beiden DBE zu einer rapiden und zeitlich abhängigen Ansäuerung der Flüssigkeit und einer schnellen Anreicherung von Nitrationen innerhalb der ersten 15 Minuten führt. Länger gewählte Behandlungszeiten bis 30 min resultieren wider Erwarten nicht in einem weiteren linearen Anstieg der Nitratkonzentration, sondern führen zu einem Plateau. Die Anwesenheit von Nitrat im Wasser belegt, dass sich die in den FTIR-Messungen detektierten  $\text{HNO}_3$ -Moleküle in der Flüssigkeit lösen und somit sowohl Bestandteile der Gas- als auch der flüssigen Phase sind. Demgegenüber steigen die Nitritkonzentrationen nur innerhalb der ersten 10 Minuten auf ein Maximum an. Anschließend nimmt die Menge an Nitriten in allen Proben stetig ab. Auch wenn die Kurvenverläufe für Nitrit und Nitrat bei epoxidharz- und keramikbasierter DBE ähnlich sind, sind die gemessenen Konzentrationen dieser Moleküle bei der keramikbasierten DBE höher. In Studien von Oehmigen *et al.* und Ikawa *et al.* wurde die durch Luftplasma induzierte Ansäuerung eines ungepufferten wässrigen Systems auf die gebildeten stickstoffhaltigen Verbindungen Salpetersäure und salpetrige Säure zurückgeführt<sup>(54, 104)</sup>. Der in diesen Arbeiten postulierte Zusammenhang zwischen saurem pH-Wert und Anreicherung stickstoffhaltiger Verbindungen in plasmabehandelter Flüssigkeit kann auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden.

Im Kontrast zu den ähnlichen kinetischen Verläufen der Nitrit- und Nitratbildung bei beiden in Luft betriebenen DBE verhält es sich unter denselben Betriebsbedingungen mit der Bildungskinetik von Wasserstoffperoxidmolekülen ganz anders (s. Abbildung 36c). Während eine Behandlung mit der epoxidharzbasierten DBE zu einer zeitlich abhängigen und relativ starken



**Abbildung 36:** In destilliertem Wasser gemessene a) pH-Werte und Konzentrationen von b) NO<sub>2</sub> [mg/l], c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [mg/l] und d) NO<sub>3</sub> [mg/l] in Abhängigkeit von der Behandlungszeit  $t_1$  [min], welche nach Behandlung mit epoxidharz- und keramikbasierter DBE aufgezeichnet wurden<sup>(69)</sup>. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben.

Anreicherung (Endkonzentration von 18 mg/l) von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt, resultiert die Behandlung mit der keramikbasierten DBE wider Erwarten in nur sehr geringen (< 1 mg/l) und zeitlich konstanten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen. Normalerweise wird die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in plasmabehandelterm Wasser als eine Messgröße für reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Hydroxylradikale (OH•), Peroxylradikale (HOO•) und Superoxidradikale (O<sub>2</sub>•-) in der Plasmagasphase herangezogen, da diese Moleküle in Kontakt mit Wasser und in gleichzeitiger Abwesenheit von organischen Verbindungen zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagieren<sup>(69, 105-107)</sup>. Die geringen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Proben der keramikbasierten DBE könnten daher ein Hinweis darauf sein, dass relativ wenig reaktive Sauerstoffspezies in der Plasma-/Gasphase gebildet werden. Diese Möglichkeit wird durch die

oben beschriebenen Ergebnisse der OES- und FTIR-Messungen untermauert. In der Plasma-/Gasphase konnten überwiegend Stickstoffmoleküle oder Stickoxide nachgewiesen werden, während Ozon als einzige reine Sauerstoffverbindung detektiert wurde. Die geringe Menge an  $\text{H}_2\text{O}_2$  könnte jedoch auch auf den theoretisch möglichen Prozess der Photodissoziation zurückgeführt werden, da Strahlungen bei Wellenlängen von  $248\text{ nm}^{(108)}$ ,  $308\text{ nm}^{(108)}$ ,  $400\text{ nm}^{(109)}$  und  $405\text{ nm}^{(110)}$  die Dissoziation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in wässrigen Lösungen begünstigen. Die 4,6-fach höhere eingespeiste Energie bei der keramikbasierten DBE wird wahrscheinlich die entstehende Strahlung auf die flüssige Grenzfläche intensivieren und könnte somit eine gesteigerte Dissoziation der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Moleküle verursachen. Dies wiederum könnte die geringen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen in den Proben begründen.

Schlussendlich liegen nach 30 min Plasmabehandlung bei beiden Plasmaquellen sowohl die pH-Absenkung in 5 ml Wasser als auch die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat in ähnlichen Größenordnungen (s. Tabelle 16). Die höheren Konzentrationen von Nitrat und Nitrit nach Einwirkung der keramikbasierten DBE auf die Proben können (ebenfalls) durch die durchschnittlich höher eingespeiste Energie begründet werden.

**Tabelle 16: Chemische Zusammensetzung von destilliertem Wasser nach 30-minütiger CAP-Behandlung mit epoxidharz- und keramikbasierter DBE<sup>(69)</sup>.**

Parameter	Epoxidharz DBE	Keramik DBE
Flüssigkeitsanalyse [mg/l]		
• $\text{NO}_3^-$ nach 30 min PB	113	211
• $\text{H}_2\text{O}_2$ nach 30 min PB	18	0,72
• $\text{NO}_2^-$ nach 30 min PB	1,5	6,45
• pH nach 30 min PB	2,78	2,66

Trotz der mehr oder weniger deutlichen Unterschiede in den verwendeten Materialien, den elektrischen Parametern und den ermittelten Ergebnissen der Flüssigkeitsanalyse sind die beobachteten mikrobiologischen Effekte der beiden Entladungen sehr ähnlich. In beiden Fällen wurde innerhalb von 5-7 min eine  $6\text{-log}_{10}$ -Reduktion im bakteriellen Wachstum von *E. coli* nachgewiesen (s. Abbildung 37). Daher kann an dieser Stelle ein erstes Zwischenfazit gezogen werden. Plasmaquellen mit unterschiedlichen technischen Parametern können trotz ihrer deutlichen Unterschiede gleiche biologische Effekte erzielen. Die Differenzen zwischen der epoxidharz- und keramikbasierten DBE spiegeln sich vor allem in der Gasphasen- (FTIR) und Flüssigkeitschemie wieder. Die Tatsache, dass gleiche biologische Effekte bei unterschiedlicher Gasphasen- (FTIR) und Flüssigkeitschemie erzielt werden können, bestätigt die Notwendigkeit einer umfassenden Quellencharakterisierung, wie sie in der DIN SPEC 91315



"Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen"<sup>(59)</sup> bereits empfohlen wird. Hierbei sei explizit drauf hingewiesen, dass eine Quellencharakterisierung mit Hinblick auf zu erwartende biologische Effekte gegenwärtig nicht allein auf der Basis plasmaphysikalischer und/oder

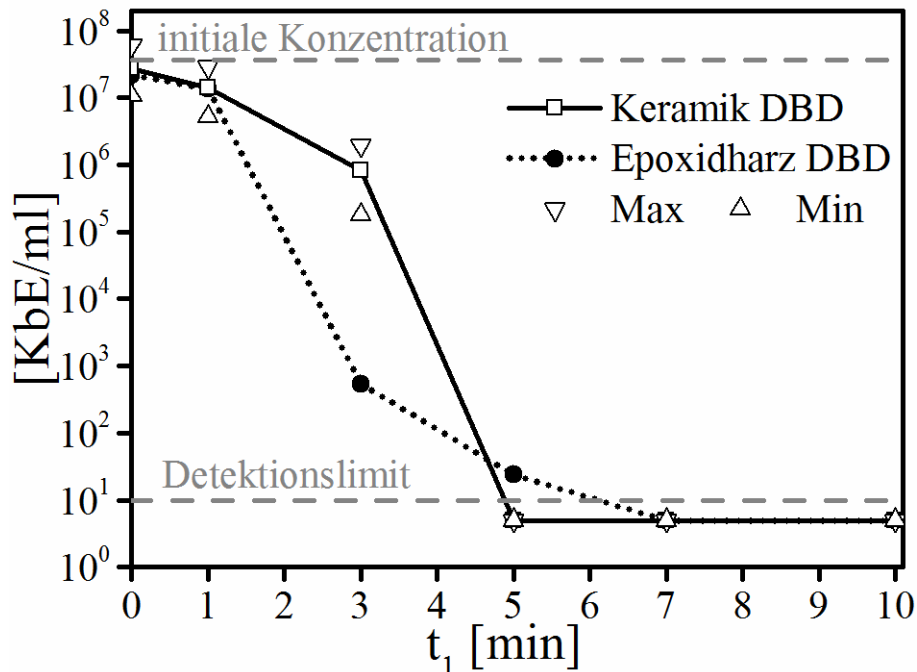
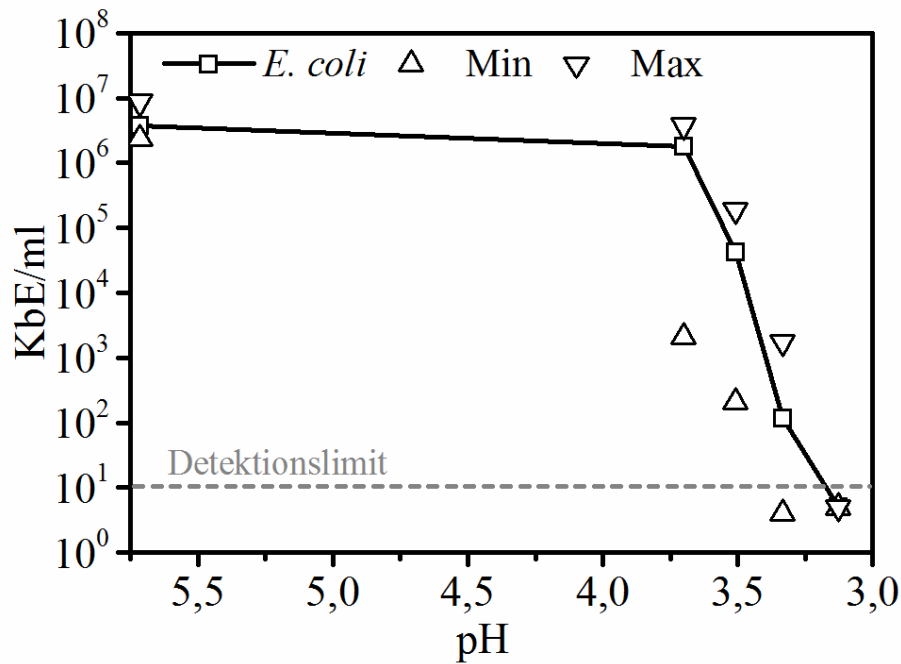


Abbildung 37: Durch epoxidharz- und keramikbasierter DBE induzierte Wachstumshemmung von *E. coli* in Abhängigkeit von der CAP-Behandlungszeit  $t_1$  [min]. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben.

plasmachemischer Tests erfolgen kann. Es wird immer ein biologischen Testsystem benötigt, da die biologischen Plasmaeffekte offenbar das Resultat von sehr komplexen Interaktionen unterschiedlicher Plasmakomponenten sind, welche sich scheinbar zumindest teilweise gegenseitig kompensieren können. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass epoxidharz- und keramikbasiert DBE die gleichen biologischen Effekte zeigen, obwohl letztere  $H_2O_2$  nur in sehr geringen Mengen produziert. Die exakten Mechanismen, die für die antimikrobielle Wirkung des Plasmas verantwortlich sind, sind derzeit jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt und es bedarf weiterer Untersuchungen in diesem Bereich.

Neben der Bildung von  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  und  $H_2O_2$  war die Beobachtung auffällig, dass starke Reduktionen im bakteriellen Wachstum bei beiden DBE erst unterhalb eines bestimmten pH-Wertes ( $< 4$ ) erzielt werden konnten. Die pH-Abhängigkeit des antimikrobiellen Effektes ist daher graphisch in Abbildung 38 dargestellt und geht mit den Erkenntnissen von Oehmigen *et al.*<sup>(54)</sup> konform.



**Abbildung 38: Vitalität von *E. coli* in 0,85 %iger NaCl-Lösung in Korrelation mit der CAP-induzierten pH-Verschiebung (x-Achse) in den sauren Bereich. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben.**

Der essentielle Einfluss des sauren pH-Wertes auf die antimikrobiellen Effekte der DBE wurde somit deutlich gezeigt. Da der verwendete Testmikroorganismus (*E. coli*) ein Enterobakterium ist, das durch die Aufrechterhaltung eines zytoplasmatischen pH-Bereiches zwischen 7,2 und 7,8 in der Lage ist, bei extremen pH-Werten zwischen 4,5 und 9 zu wachsen<sup>(111)</sup>, wurde davon ausgegangen, dass die alleinige pH-Absenkung keinen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum haben sollte. Trotzdem musste geprüft werden, ob die beobachteten antimikrobiellen Effekte nur eine Folge des abgesenkten pH-Wertes sind oder reaktive Spezies in der Flüssigkeit eine zusätzliche Rolle hierbei spielen. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe einer salz- und salpetersauren NaCl-Lösung geprüft, ob eine reine pH-Verschiebung in den sauren Bereich (pH 2,6) ausreichend ist, um *E. coli*-Kulturen in ihrem Wachstum zu hemmen. In Abbildung 39 und Abbildung 40 ist das Überleben von *E. coli* in salz- bzw. salpetersauren NaCl-Lösungen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit  $t_3$  dargestellt.

Sowohl in salz- als auch in salpetersauren nährstoffarmen NaCl-Lösungen waren die verwendeten *E. coli*-Kulturen für mindestens 60 Minuten überlebensfähig, ohne in ihren Ausgangskonzentrationen reduziert worden zu sein. Dies belegt, dass die im Zusammenhang mit der Plasmabehandlung einhergehende pH-Wertabsenkung nicht allein für die antimikrobiellen

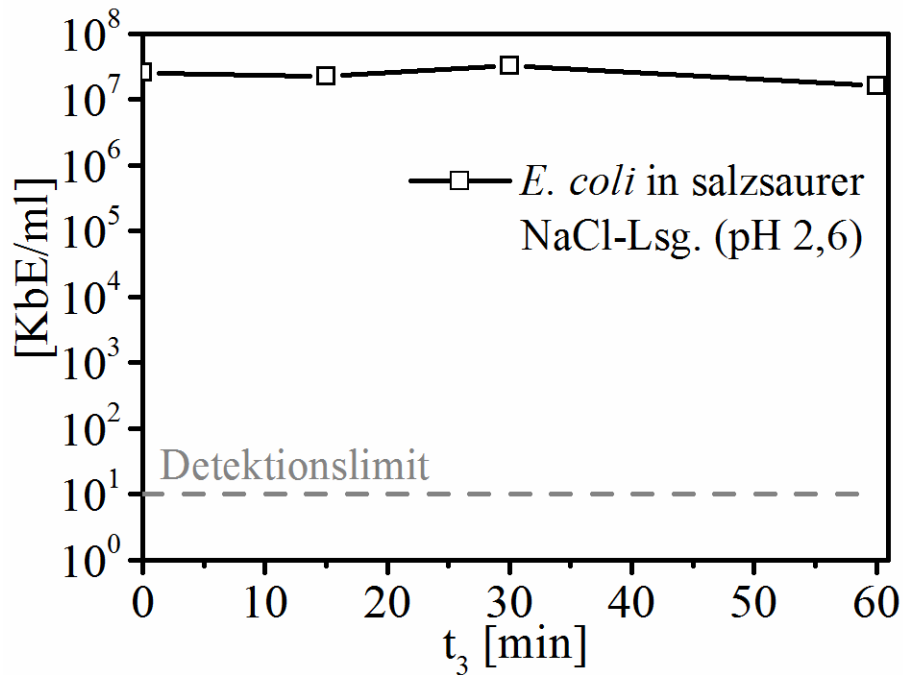


Abbildung 39: Vitalität von *E. coli* in salzsaurer NaCl-Lösung (pH 2,6) in Abhängigkeit zur Einwirkzeit  $t_3$  [min].

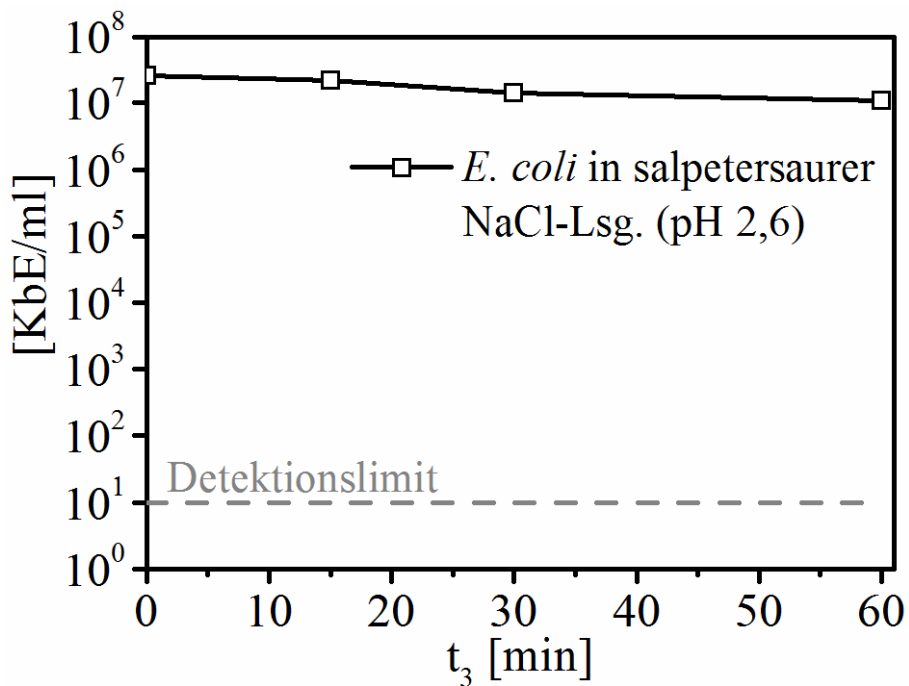
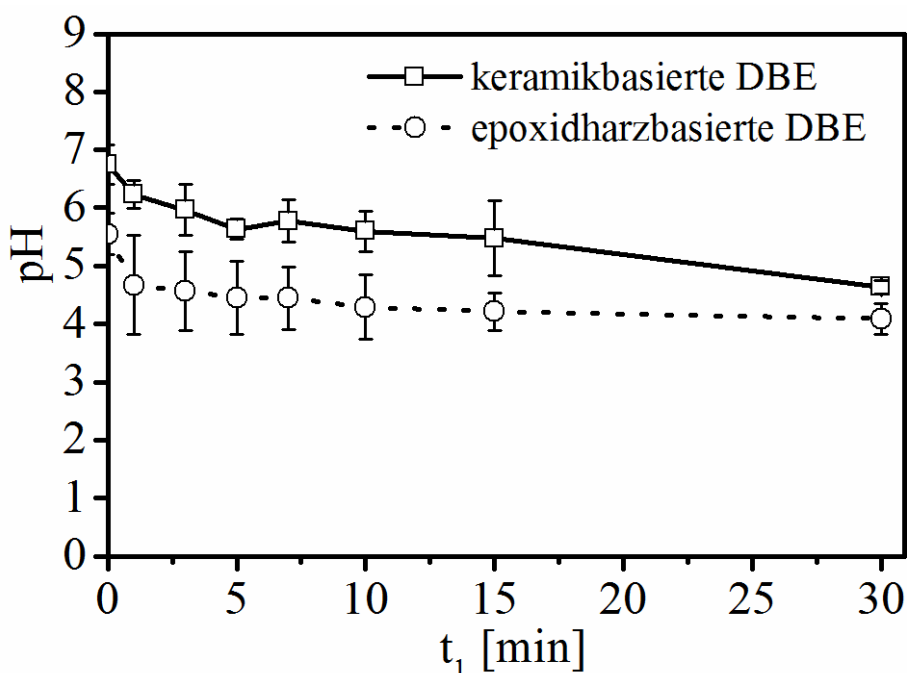


Abbildung 40: Vitalität von *E. coli* in salpetersaurer NaCl-Lösung (pH 2,6) in Abhängigkeit zur Einwirkzeit  $t_3$  [min].

Plasmaeffekte verantwortlich gemacht werden kann. Die Verwendung von Salpetersäure für die Einstellung des sauren pH-Wertes zeigt ebenfalls, dass die alleinige Anwesenheit von  $NO_3^-$  im sauren Milieu keinen Einfluss auf die antimikrobiellen Effekte hat. Es kann daher angenommen werden, dass die eigentlichen Wirkmechanismen komplexer sind als anfänglich vermutet. Wie bereits oben beschrieben, kann die Ansäuerung der Flüssigkeit auf die Bildung von

stickstoffhaltigen Verbindungen, wie zum Beispiel Salpetersäure oder auch salpetrige Säure, zurückgeführt werden<sup>(54, 104)</sup>. Bei der nachweislichen Anwesenheit von mindestens einer weiteren reaktiven Spezies ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) stellte sich nun die Frage, ob die pH-Absenkung ausschließlich auf die beiden stickstoffhaltigen Moleküle ( $\text{HNO}_2$  und  $\text{HNO}_3$ ) zurückgeführt werden kann, oder ob es in Abwesenheit von Stickstoffverbindungen auch zu einer pH-Verschiebung kommt. Daher wurden Untersuchungen durchgeführt, in denen die epoxidharzbasierte und keramikbasierte DBE in Argonatmosphäre betrieben wurde. Diese haben gezeigt, dass eine leichte pH-Abnahme auch in Abwesenheit von Stickstoff und Sauerstoff im Arbeitsgas gefunden wurde (s. Abbildung 41).



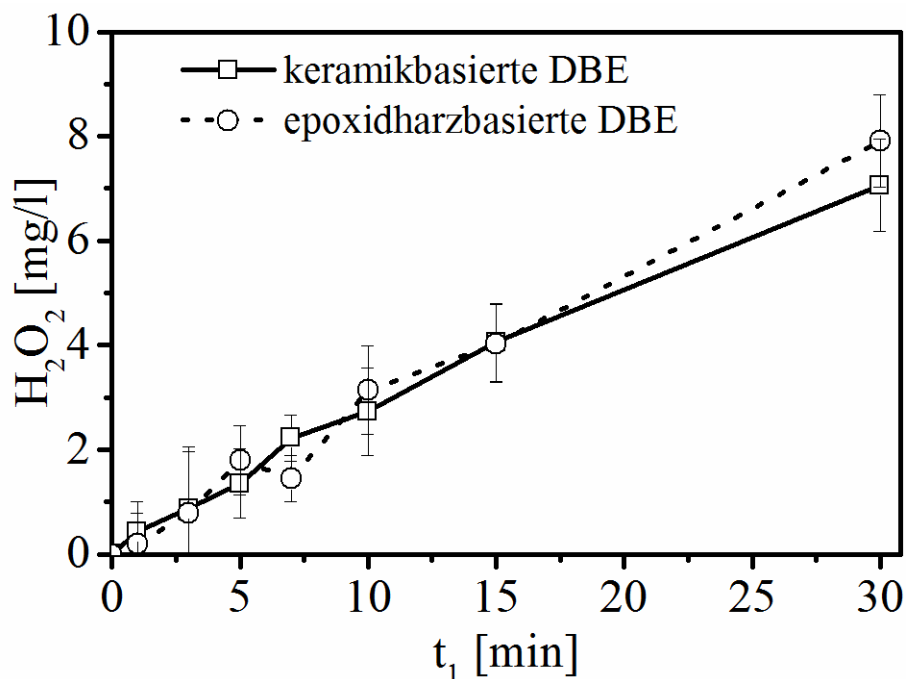
**Abbildung 41:** In destilliertem Wasser gemessene pH-Werte in Abhängigkeit von der Behandlungszeit  $t_1$  [min], die nach Behandlung mit epoxidharz- und keramikbasierter DBE in Argonatmosphäre aufgezeichnet wurden. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben.

Eine mögliche Erklärung für die beobachtete leichte Azidität in diesem System könnte in den Anregungseigenschaften des Argonplasmas liegen. Neben reaktiven Argonspezies werden auch  $\text{OH}^\bullet$ -Moleküle in abundanten Mengen gebildet, welche in die angrenzende Flüssigkeit diffundieren und durch Rekombination zu Wasserstoffperoxidmolekülen entsprechend der chemischen Gleichung 1 reagieren können.



Aus diesem Grund wurden neben dem pH-Wert auch die Wasserstoffperoxidkonzentrationen in den jeweiligen Wasserproben spektralphotometrisch ermittelt (s. Abbildung 42).

Sowohl die Argonplasmabehandlung mit der epoxidharzbasierten DBE als auch die Behandlung mit der keramikbasierten Entladung resultierte in einem finalen pH-Wert von ca. 4 und einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Endkonzentration von ca. 7 mg/l. Hier finden wir einen deutlichen Unterschied zu den Versuchen, die mit atmosphärischer Luft als Arbeitsgas durchgeführt wurden. Anders als bei diesen Versuchen (s. Abb. 36c) erzeugt die keramikbasierte DBE in einer Argonatmosphäre nahezu genau so viel  $\text{H}_2\text{O}_2$  wie die epoxidharzbasierte DBE. Dies könnte damit begründet werden, dass bei einem Argonplasma neben angeregten Ar-Molekülen auch immer angeregte OH-Moleküle in abundanten Mengen vorliegen/generiert werden. Bei beiden Entladungen entstehen diese Moleküle also im Überfluss und können weiter zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagieren und sich dann wiederum in der wässrigen Phase lösen. Hierbei stellt die Flüssigkeitsoberfläche die Grenzfläche zwischen den beiden Phasen Gas und Flüssig dar. Bei beiden DBE ist diese Grenzfläche sowie die CAP-Behandlungszeit gleich groß. Eine mögliche Begründung für die annähernd gleichen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen nach epoxidharz- und keramikbasierter DBE Exposition könnte sein, dass sich aufgrund der limitierten Grenzfläche nur eine limitierte Anzahl von Molekülen innerhalb der jeweiligen Behandlungszeit in der Flüssigkeit lösen können.



**Abbildung 42:** In destilliertem Wasser gemessene  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen [mg/l] in Abhängigkeit von der Behandlungszeit  $t_1$  [min], welche nach Behandlung mit epoxidharz- und keramikbasierter DBE in Argonatmosphäre aufgezeichnet wurden. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindesten drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben.

Die direkte Korrelation zwischen pH-Wert-Verschiebung und der Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Molekülen zeigt, dass neben reaktiven Stickstoffverbindungen auch reaktive Sauerstoffverbindungen einen Einfluss auf die Azidität von plasmabehandelten Flüssigkeiten haben. Es hat sich auch

gezeigt, dass Arbeitsgase mit mehreren Komponenten (z.B. Luft) die Verschiebung des pH-Wertes stärker beeinträchtigen als ein reines Argonsystem. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die pH-Absenkung im DBE-behandelten Wasser nicht ausschließlich auf die Bildung von  $\text{HNO}_3$  und  $\text{HNO}_2$  zurückgeführt werden kann. Es zeigt sich also, dass plasmainduzierte pH-Änderungen durch RNS und ROS verursacht werden können und sehr stark vom verwendeten Arbeitsgas abhängig sind.

Wenn sowohl reaktive Stickstoffspezies als auch reaktive Sauerstoffspezies in unterschiedlichem Maße den pH-Wert einer plasmabehandelten Lösung beeinflussen, kann angenommen werden, dass diese verschiedenen reaktiven Spezies auch in unterschiedlichem Maße an der antimikrobiellen Wirkung beteiligt sind. Diese Theorie wird durch die Tatsache untermauert, dass die keramikbasierte DBE weit geringere Mengen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  generiert als das epoxidharzbasierte Bezugssystem und trotzdem eine ähnliche antimikrobielle Wirksamkeit aufweist. Zudem wurden in der Arbeit von Oehmigen *et al.* Mikroorganismen mit der epoxidharzbasierten DBE in einer reinen Argonatmosphäre plasmabehandelt und keine antimikrobiellen Effekte beobachtet<sup>(29)</sup>. Dies ist sogar ein Hinweis darauf, dass ROS keinen Einfluss auf die antimikrobiellen Plasmaeffekte haben. Daher sollte mit einem neuen Versuchsaufbau untersucht werden, inwieweit ROS einen Einfluss auf die antimikrobiellen Plasmaeffekte haben und ob RNS für die keimreduzierende Wirkung essentiell sind.

### **5.2 Einfluss des ROS/RNS-Gehaltes auf die antimikrobiellen Effekte eines Plasmajets**

Der Einfluss des ROS/RNS-Gehaltes auf die antimikrobiellen Plasmaeffekte wurde aus technischen Gründen mit dem kINPen 09 und nicht mit den DBE durchgeführt, da diese zur Klärung dieser spezifischen Fragestellung nicht ohne weiteres anwendbar waren. Bei Verwendung der DBE hätte mit jeder Arbeitsgasänderung auch eine individuelle Anpassung der elektrischen Betriebsparameter durchgeführt werden müssen. Anderenfalls wäre es nicht möglich gewesen, unter allen Bedingungen ein homogenes und stabiles Plasma über der gesamten Elektrodenfläche zu generieren. Jedoch wären im Fall der individuellen Anpassung der Betriebsparameter die angedachten DBE-Versuche, bei denen mit unterschiedlichen Arbeitsgasen gearbeitet werden sollte, nur begrenzt miteinander vergleichbar. Daher wurden die technisch sehr schwer umzusetzenden arbeitsgasrelevanten Fragestellungen an dieser Stelle ausnahmsweise nicht mit einer der beiden DBE, sondern mit dem argonbetriebenen kINP 09 bearbeitet. Die Bedeutung von ROS und RNS für die keimreduzierende Wirkung von CAP wurde an *E. coli* getestet.

Mit Hilfe eines von außen auf den kINPen 09 aufgebrachten Gasschutzmantels (s. Abbildung 12) wurde die Zusammensetzung der reaktiven Spezies in der Plasma-/Gasphase eingestellt und deren Auswirkung auf die Chemie innerhalb der Flüssigkeit widergespiegelt. An dieser Stelle soll kurz auf die Funktionsweise des kINPen 09 eingegangen werden. Der kINPen wird mit Argon als Arbeitsgas betrieben, das heißt es handelt sich hier um ein Argonplasma, welches in der Kapillare gezündet wird. Der Gasstrom des Arbeitsgases befördert den sog. "Effluenten" zur Spitze des stiftförmigen Gerätes. ROS und RNS werden über den Kontakt des Effluenten mit der Umgebungsluft und dem daraus resultierenden Einmischen von Sauerstoff und Stickstoff, gebildet. Durch das Aufbringen des Gasschutzmantels ist eine Steuerung und Kontrolle von Art und Menge der eingemischten Moleküle – im vorliegenden Fall Sauerstoff und Stickstoff – möglich. Mit diesem speziellen experimentellen Aufbau ist es somit möglich die Bildung von ROS und RNS im Effluenten künstlich zu beeinflussen<sup>(71)</sup>. Die für die Versuche gewählten Schutzgasatmosphären sind in Tabelle 17 wiedergegeben und reichen von stickstoffreich und sauerstoffarm bis sauerstoffreich und stickstoffarm. Neben der Prüfung auf eine antimikrobielle

**Tabelle 17: Prozentuale Zusammensetzung des verwendeten Gasschutzmantels zur Bestimmung der keim-reduzierenden Effekte des kINPen09.**

Sauerstoffgehalt [%]	Stickstoffgehalt [%]
0	100
25	75
50	50
75	25
100	0

Wirkung wurde auch eine nass-chemische Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Relevanz von ROS und RNS für die keimreduzierende Wirkung von CAP diskutiert und zusätzlich mit einer ähnlichen Studie an Eukaryoten verglichen. In Abbildung 43 sind die Inaktivierungskurven von *E. coli* für verschiedene Schutzgaseinstellungen dargestellt. Bei der Verwendung einer reinen Stickstoff- oder Sauerstoffschutzgasatmosphäre zeigt sich keine Reduktion des bakteriellen Wachstums. Bei Schutzgasatmosphären, die sowohl N<sub>2</sub> als auch O<sub>2</sub> beinhalten, reduziert sich die Anzahl der KbE/ml, wobei der antimikrobielle Effekt bei eher kurzen Behandlungszeiten wenig ausgeprägt ist. Jedoch zeigt sich nach 10 min eine sehr effektive Reduktion von ca. 6 log<sub>10</sub>-Stufen. Nach 12 min fällt bei einem Verhältnis von 75% Stickstoff zu 25% Sauerstoff und einem Verhältnis von 50% Stickstoff zu 50% Sauerstoff die Anzahl der KbE/ml unter das Detektionslimit. Bei einem noch höheren Sauerstoffgehalt und

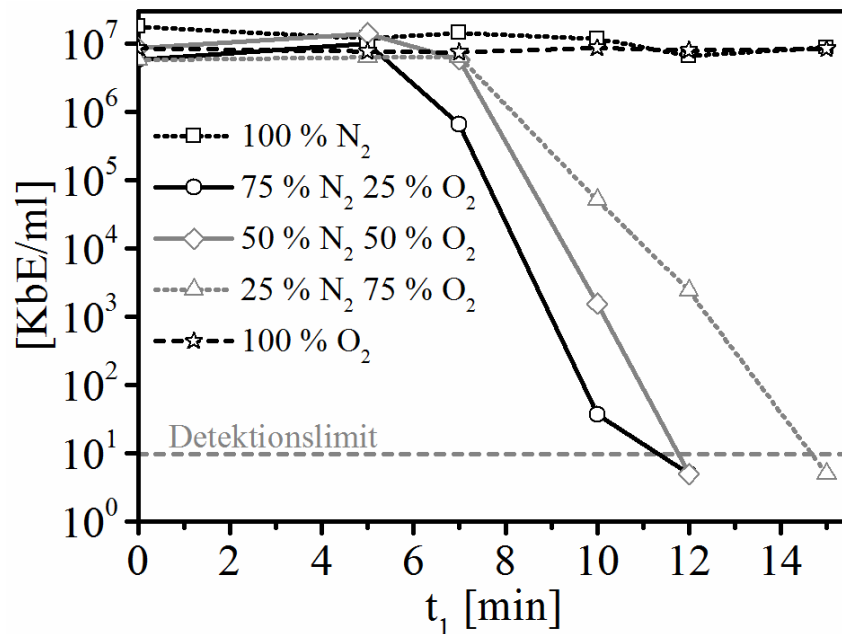


Abbildung 43: Vitalität von *E. coli* in 0,85 %iger NaCl-Lösung in Abhängigkeit von der CAP-Behandlungszeit  $t_1$  [min] unter Verwendung verschiedener Schutzgasatmosphären<sup>(112)</sup>. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindesten drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ).

geringerem Stickstoffanteil wird das Detektionslimit frühestens nach 15 min erreicht. Da sich nach 10 min Plasmabehandlung starke Reduktionen im bakteriellen Wachstum nachweisen lassen, wurde hierzu eine Flüssigkeitsanalyse für alle Schutzgasatmosphären durchgeführt. Abbildung 44 zeigt die pH-Werte (a) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (b) in 0,85 % NaCl-Lösung nach 10 min CAP-Behandlung mit unterschiedlichen Schutzgaszusammensetzungen.

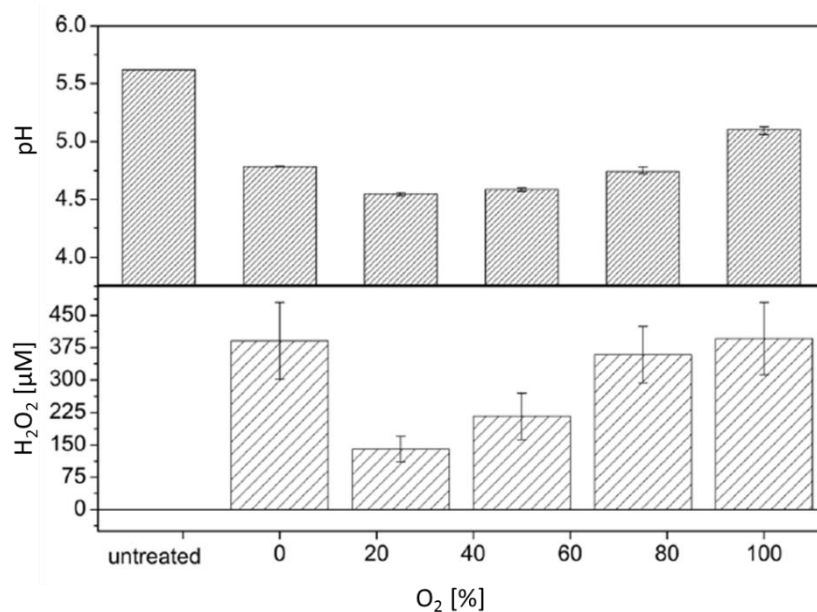


Abbildung 44: pH-Werte (a) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (b) von 0,85% NaCl-Lösung nach 10 min CAP-Behandlung mit unterschiedlichen Schutzgaszusammensetzungen<sup>(112)</sup>. Die entsprechenden Konzentrationen sind als Funktion des prozentualen Sauerstoffanteils im sauerstoff- und/oder stickstoffhaltigen Gas-schutzmantel dargestellt. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ .

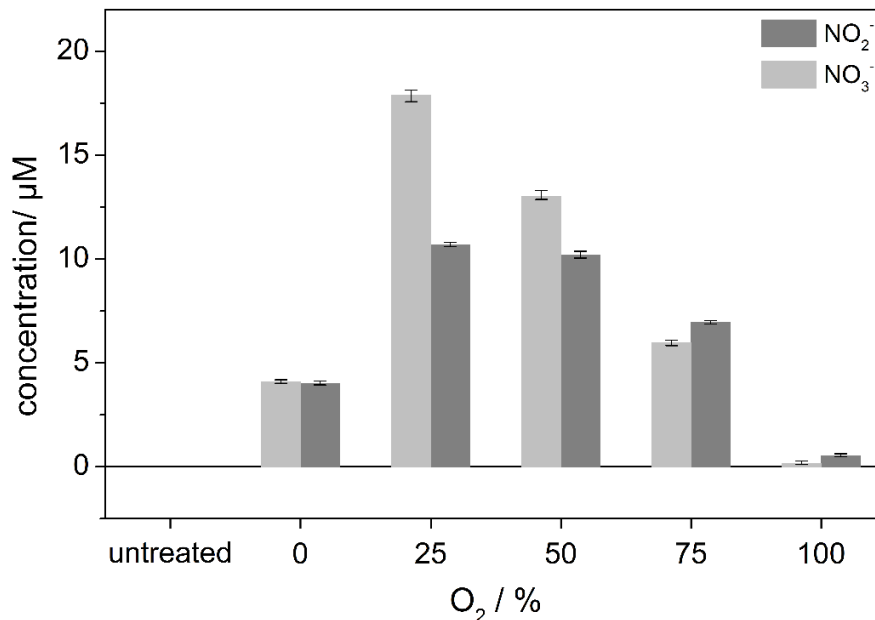


Die entsprechenden Konzentrationen sind als Funktion des prozentualen Sauerstoffanteils im sauerstoff- und/oder stickstoffhaltigen Gasschutzmantel dargestellt. Die unbehandelte NaCl-Lösung weist einen pH-Wert von 5,6 auf. Im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle führt bei allen Schutzgasatmosphären die CAP-Behandlung zu einer pH-Wert-Absenkung. Die Größenordnung des Abfalls ist stark von der verwendeten Gaszusammensetzung abhängig. Bei reinem Sauerstoff wird die geringste pH-Wert-Absenkung beobachtet. Bei Verwendung von reinem Stickstoff und einer Schutzgaszusammensetzung von 25 % Stickstoff und 75 % Sauerstoff wird annähernd der gleiche pH-Wert-Abfall auf 4,7 beobachtet. Der niedrigste pH-Wert wird bei einer Gasmischung von 25 % Sauerstoff und 75 % Stickstoff gemessen. Diese Schutzgasatmosphäre entspricht fast der Sauerstoff- und Stickstoffzusammensetzung von Luft<sup>(112)</sup>. Unter diesen Bedingungen zeigt sich ebenfalls, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit der geringen Konzentration von 97  $\mu\text{M}$  (1,75 mg/L) nachgewiesen wird. Im Kontrast dazu wird bei der Verwendung von reinem Sauerstoff oder Stickstoff die fast dreifache Menge an  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet. In Abbildung 45 sind die Nitrit- und Nitratkonzentration von 0,85 %iger NaCl-Lösung nach 10 min CAP-Behandlung mit unterschiedlichen Schutzgaszusammensetzungen dargestellt. Die entsprechenden Konzentrationen sind als Funktion des prozentualen Sauerstoffanteils im sauerstoff- und/oder stickstoffhaltigen Gasschutzmantel dargestellt. Die geringsten  $\text{NO}_2^-$ - und  $\text{NO}_3^-$ -Konzentration werden bei einem Sauerstoffgehalt 100 % im Schutzgasmantel gemessen. Bei der Verwendung von 100 % Stickstoff werden ebenfalls nur geringe Mengen der beiden Verbindungen nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen von  $\text{NO}_2^-$  (18  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{NO}_3^-$  (11  $\mu\text{M}$ ) werden bei einer Schutzgaszusammensetzung von 25 % Sauerstoff und 75 % Stickstoff erhalten. Bei höheren Sauerstoff- und geringeren Stickstoffanteilen im Schutzgas nehmen die Konzentrationen von  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  ab.

Die durchgeführte Flüssigkeitsanalyse zeigt, dass mit Hilfe eines Gasschutzmantels über eine Variation der Zumischung von  $\text{N}_2$  und  $\text{O}_2$  zum Effluenten des Plasmajets die Zusammensetzung der reaktiven Spezies in der Flüssigkeit manipuliert werden kann. Es hat sich ebenfalls herauskristallisiert, dass diese Manipulationen mit den antimikrobiellen Effekten der CAP-Behandlung korrelieren. Bei einer Gaszusammensetzung von 75 %  $\text{N}_2$  zu 25 %  $\text{O}_2$  wurde:

1. der stärkste antimikrobielle Effekt,
2. die stärkste Ansäuerung,
3. die höchsten Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen,
4. die geringste  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration

gefunden. Folglich scheinen ROS, hier repräsentiert durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ , eine geringere Rolle bei der direkten Inaktivierung von Mikroorganismen zu spielen. Trotzdem scheinen sie essentieller Reaktionspartner für die reaktiven Stickstoffspezies zu sein, da in einer reinen  $\text{N}_2$ -Atmosphäre kein antimikrobieller Effekt nachweisbar war. Für die keimreduzierende Wirkung von CAP werden daher offenbar sowohl sauerstoff- als auch stickstoffhaltige reaktive Spezies benötigt. Bei der Verwendung von Schutzgasatmosphären mit unterschiedlichen Sauerstoff-zu-Stickstoff-Verhältnissen variierte einzig die für die Erreichung des Detektionslimits erforderliche Behandlungszeit. Pavlovich *et al.*<sup>(113)</sup> berichteten ebenfalls von einer verstärkten Wachstums- hemmung in einer NO-reichen Umgebung, dem sog.  $\text{NO}_x$ -mode. Da die RNS eine zentrale Rolle bei der Inaktivierung von Mikroorganismen einnehmen, werden zu einem späteren Zeitpunkt einige vielversprechende stickstoffhaltige Verbindungen in diesem Zusammenhang diskutiert.



**Abbildung 45:** Nitrit- und Nitratkonzentrationen von 0,85 % NaCl-Lösung nach 10 min CAP-Behandlung mit unterschiedlichen Schutzgaszusammensetzungen.<sup>(112)</sup> Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ .

Reuter *et al.*<sup>(35)</sup> untersuchten den Einfluss der Schutzgaszusammensetzung des Plasmajets auf humane Kerationzyten. Diese Untersuchungen wurden unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wie in der hier vorliegenden Arbeit. Einzig die Behandlungszeiten waren 3 min kürzer, was auf die unterschiedlichen Empfindlichkeiten von Pro- und Eukaryoten zurückzuführen ist<sup>(112)</sup>. Ein Vergleich der beiden Studien ist dennoch möglich, da sowohl der Trend als auch die Größenordnungen der Konzentrationen von RNS und ROS ähnlich sind<sup>(112)</sup>. Aus den beiden Arbeiten geht hervor, dass die verwendeten Schutzgaszusammensetzungen die Vitalität von Prokaryoten und Eukaryoten unterschiedlich beeinflussen. So wird die Vitalität von Eukaryoten

unter relativ sauerstoffarmen (0-40 %) Schutzgasbedingungen nur geringfügig verändert. Bei weiter zunehmender Sauerstoffkonzentration im Schutzmantel nimmt diese jedoch signifikant ab. Die geringste Überlebensrate von Eukaryoten wurde bei reinem Sauerstoff als Mantelgas nachgewiesen. Der Vitalitätsabfall verhält sich proportional zum Sauerstoffgehalt. Im Fall von Prokaryoten wurde ein umgekehrtes Verhalten beobachtet. Unter einer sauerstoffarmen (25 % O<sub>2</sub>, 75 % N<sub>2</sub>) Atmosphäre zeigte sich eine Wachstumshemmung von 5 log<sub>10</sub>-Stufen nach 10 min CAP-Behandlung. Mit zunehmenden Sauerstoffgehalt im Mantelgas fiel die Wachstumshemmung stetig ab. Die geringste Hemmung wurde bei reinem Sauerstoff und reinem Stickstoff nachgewiesen.

Aus den dargelegten Ergebnissen kann eine erste Schlussfolgerung gezogen werden, die jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig macht. Unter Schutzgasbedingungen, die der atmosphärischen Luft (20 % O<sub>2</sub>, 80 % N<sub>2</sub>) ähnlich sind, können Prokaryoten durch CAP inaktiviert werden, ohne Eukaryoten einen wesentlichen Schaden zu zufügen. Die Selektivität kann damit begründet werden, dass Eukaryoten über bestimmte Signalwege und eine Vielzahl von Scavengern verfügen, die die intrazelluläre ROS-Homöostase kontrollieren und effektiv aufrechterhalten<sup>(114)</sup>. Resistenzgene, die exklusiv im eukaryotischen Genom gefunden werden, sind eine weitere Begründung für die selektive Wirkung der CAP-Behandlung<sup>(115)</sup>.

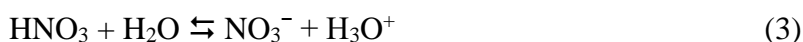
Die in den Abschnitten 5.3 und 5.4 dargelegten analytischen und mikrobiologischen Ergebnisse zeigen, wie wichtig die chemischen Prozesse in der flüssigen Phase für die keimreduzierenden Effekte von CAP sind.

Daher unterstützen die gefundenen Zusammenhänge zwischen Mantelgaszusammensetzung und chemischen bzw. biologischen Effekten die Hypothese, dass die biologischen Plasmaeffekte durch das flüssige Medium auf die eukaryotische bzw. prokaryotische Zelle übertragen werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wird davon ausgegangen, dass die plasmainduzierte Flüssigkeitschemie eine entscheidende Rolle in den antimikrobiellen Effekten einnimmt und ihrer Vielfältigkeit betrachtet werden muss. Daher soll sie an dieser Stelle detailliert diskutiert werden.

### **5.3 Betrachtungen zur atmosphärendruckplasmainduzierten Flüssigkeitschemie innerhalb wässriger Lösungen**

Eine Anreicherung von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> innerhalb der flüssigen Phase ist das Ergebnis der CAP-induzierten Gasphasen-Dissoziation von Stickstoff (N) und Sauerstoff (O) mit anschließender Bildung von Stickoxiden wie Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>), Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O), Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>), Distickstoffpentoxid (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) und Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>)<sup>(24, 28, 49, 69, 99)</sup>. Für NO<sub>2</sub>

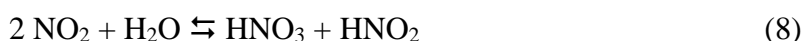
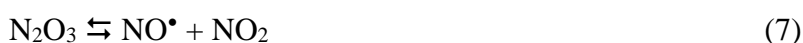
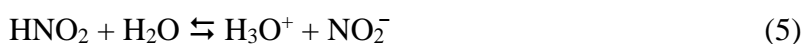
und  $\text{HNO}_3$  ist bekannt, dass beide Verbindungen leicht wasserlöslich sind und sich gut in den verwendeten wässrigen Medien anreichern<sup>(24, 49, 69)</sup>. In wässrigen Lösungen bildet  $\text{NO}_2$  über einen sog. Elektroneneinfang  $\text{NO}_2^-$ - und  $\text{NO}_3^-$ -Moleküle (Gleichung 2), während  $\text{HNO}_3$  entsprechend Gleichung 3 dissoziiert<sup>(24, 49)</sup>.



Beide Reaktionswege führen zur Bildung von freien Hydroniumionen ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ), die den pH-Wert der CAP-behandelten Proben herabsetzen<sup>(49)</sup>. Es wird daher angenommen, dass  $\text{HNO}_3$  und  $\text{NO}_2$  für die Absenkung des pH-Wertes verantwortlich sind. Da sich die Chemie von DBE jedoch weit komplexer gestaltet (s. Abbildung 34 und Abbildung 35), kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur  $\text{NO}_2$ -Moleküle und  $\text{HNO}_3$ -Moleküle gebildet werden. Demzufolge müssen weitere reaktive Spezies sowie ihre Nebenprodukte als Quelle von  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen in Betracht gezogen werden. In der Literatur wird  $\text{NO}^\bullet$  als Bestandteil der Plasma-/Gasphase beschrieben<sup>(23, 24)</sup>, daher wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass  $\text{NO}^\bullet$  durch die hier verwendeten DBEs sowie den kINPen 09 ebenfalls produziert wird. Dies kann durch die Bildung von Nitrit und Nitrat in der Plasma-/Gasphase teilweise untermauert werden. Basierend auf dieser Annahme kann davon ausgegangen werden, dass  $\text{NO}^\bullet$  das vorhandene  $\text{NO}_2$  zu  $\text{NO}_2^-$  oxidieren kann, welches wiederum in wässrigen Lösungen die schwache salpetrige Säure  $\text{HNO}_2$  ( $\text{p}K_a = 3,5$ )<sup>(101)</sup> bildet (s. Gleichung 4)<sup>(49)</sup>.



$\text{HNO}_2$  ist in sauren wässrigen Lösungen nicht stabil und dissoziiert mit steigender Konzentration zu  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{NO}_2$  und  $\text{N}_2\text{O}_3$ <sup>(23, 28, 69, 101)</sup>. Die in saurem Milieu natürlich auftretenden chemischen Reaktionen des  $\text{HNO}_2$ -Zerfalls sind in den folgenden Gleichungen dargestellt<sup>(28, 69, 101)</sup>:



Bei der Dissoziation von  $\text{HNO}_2$  entstehen in erster Linie weitere  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionen, die ebenfalls für die pH-Wert-Absenkung verantwortlich gemacht werden<sup>(28, 69)</sup>. Die Reaktionsgleichungen 6-8 zeigen einen zweistufigen Abbau von  $\text{HNO}_2$ , der zur Bildung von  $\text{HNO}_3$  führt. Darüber hinaus werden auf diesem Weg teilweise  $\text{HNO}_2$ -Moleküle regeneriert, welche dann dem Reaktionssystem erneut zur Verfügung stehen.

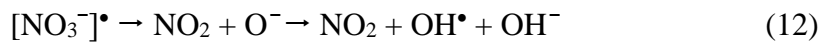
Da in CAP-behandelten NaCl-Lösungen  $\text{HNO}_2$  und  $\text{HNO}_3$  als stabile Produkte detektiert wurden, sind diese beiden reaktiven Stickstoffspezies (RNS) als hauptsächlich für die beobachtete pH-Wert-Absenkung verantwortlich. Dies stimmt mit den Aussagen von Oehmigen *et al*<sup>(28, 54)</sup>, Machala *et al*<sup>(23)</sup> und Lukes *et al*<sup>(26)</sup> überein.

Neben den dargelegten RNS spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wichtige Rollen in der CAP-induzierten Flüssigkeitschemie, welche indirekt durch die Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachgewiesen wurden<sup>(28, 49, 69)</sup>. Das Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) ist die Sauerstoffverbindung mit der größten Bedeutung, die in elektrischen Entladungen gefunden wurde. In wässrigen Medien gilt  $\text{OH}^\bullet$  als das stärkste existierende Oxidationsmittel, mit einem Oxidationspotential von  $E^\circ = 2,85 \text{ V}$ , das schnelle Reaktionen mit organischen Verbindungen eingeht<sup>(25, 49, 108, 116)</sup>. Jedoch ist die Bildung dieses sehr reaktiven neutralen Moleküls im Falle der DBE weitestgehend auf die unmittelbar umgebende Schicht der Entladung begrenzt. Mit zunehmendem Abstand zur Oberfläche der Entladung werden die entstehenden  $\text{OH}^\bullet$ -Radikale gequench und zu stabileren Spezies wie zum Beispiel  $\text{O}_3$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  konvertiert<sup>(69)</sup>. Bei der plasmaintitierten Generierung von  $\text{OH}^\bullet$  betrug dessen Lebensdauer nachweislich nur  $2,65 \mu\text{s}$ <sup>(117)</sup>. Der Abstand zwischen Entladung und Flüssigkeitsoberfläche bei den hier verwendeten DBE ist mit 5 mm sehr groß und innerhalb dieses Raumes reagieren alle  $\text{OH}^\bullet$ -Moleküle zu energetisch stabileren Produkten. Demzufolge müssen  $\text{OH}^\bullet$ -Radikale, wenn sie in der flüssigen Phase wirksam werden sollen, ein Produkt von chemischen Reaktionen oder anderen physikalischen Phänomenen sein. Die DBE produzieren neben den reaktiven Spezies auch UV-Strahlungen, welche durch die OES nachgewiesen sind<sup>(28, 69)</sup>. Daher werden durch CAP möglicherweise ausgelöste photolytische Reaktionen von Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) und CAP -generierten reaktiven Spezies wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  als Erklärung herangezogen und diskutiert.

Für die Initiierung von photolytischen Reaktionen muss die Prüflösung (0,85%ige NaCl-Lösung) Strahlung bestimmter Wellenlängen absorbieren. Da jedoch  $\text{H}_2\text{O}$  bei Wellenlängen  $\lambda > 200 \text{ nm}$  nur unwesentlich Strahlung absorbiert und beide untersuchten DBE nachweislich im Spektralbereich von 296 nm bis 457 nm emittieren, kann die Photolyse von  $\text{H}_2\text{O}$  als Quelle für  $\text{OH}^\bullet$  und die nachfolgende Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsprechend Gleichung 9 aus dieser Reaktionskette ausgeschlossen werden<sup>(49, 69)</sup>.



Trotzdem wurden in der CAP-behandelten NaCl-Lösung nicht unwesentliche Mengen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachgewiesen. Da weder die  $\text{OH}^\bullet$ -Ionen aus der Entladung selbst noch die photolytische Spaltung von Wassermolekülen die Quelle für das entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  sein können, müssen andere  $\text{OH}^\bullet$  generierende Prozesse stattfinden. Weitere mögliche Ressourcen für  $\text{OH}^\bullet$  in CAP-behandelten NaCl-Lösungen stellen die beiden Stickstoffverbindungen  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  dar, welche sowohl in der Gas- als auch in der flüssigen Phase gebildet werden<sup>(49, 69)</sup>. Für beide Verbindungen ist bekannt, dass ihre Photodissoziation zur Bildung von  $\text{OH}^\bullet$  führt<sup>(116)</sup>. Die Strahlungen ( $\lambda > 280 \text{ nm}$ ) auf  $\text{NO}_3^-$ -Moleküle resultieren in nachfolgend dargestellten photolytischen Reaktionskaskaden (Gleichung 10-13)<sup>(116)</sup>:



Ein Teil der Strahlungsenergie wird in Form von Elektronen auf das  $\text{NO}_3^-$  Molekül übertragen, wodurch sich das Radikal  $[\text{NO}_3^-]^\bullet$  bildet (s. Gleichung 10). Dieses zerfällt schnell in sehr reaktiven atomaren Sauerstoff  $\text{O} (^3\text{P})$  und  $\text{NO}_2^-$ . In den Reaktionen nach Gleichung 12-13 nimmt das Zwischenprodukt  $\text{O}^-$  als Ausgangsstoff für  $\text{OH}^\bullet$  die entscheidende Schlüsselrolle ein. Bei pH-Werten  $< 12$  protoniert  $\text{O}^-$  sehr schnell zu  $\text{OH}^\bullet$ . Zusätzlich führt die Photodissoziation von  $\text{NO}_3^-$  auch zur Bildung von  $\text{NO}_2^-$  als Nebenprodukt und ist damit eine weitere Quelle für Nitriten. Im Zusammenhang mit photochemischen Reaktionen muss auch die Dissoziation von  $\text{NO}_2^-$  mittels UV-Strahlung als Quelle von  $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen diskutiert werden. Strahlungen zwischen 200 nm und 400 nm führen zur Bildung von  $\text{O}^-$  und  $\text{NO}^\bullet$  als Produkte der in den Gleichungen 14 und 15 dargestellten Reaktionen.



Basierend auf den Gleichung 10-15 wird geschlussfolgert, dass die photolytische Spaltung von  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NO}_2^-$  ein möglicher Ursprung von  $\text{OH}^\bullet$  ist.

Neben der gezeigten Photolyse von  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NO}_2^-$  ist prinzipiell auch die photolytische Spaltung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Wellenlängen zwischen 200-300 nm möglich (s. Gleichung 16), jedoch ist diese Reaktion durch die geringe Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den CAP-behandelten Proben sehr begrenzt. Daher ist die UV induzierte Dissoziation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach Gleichung 16 als Hauptquelle von  $\text{OH}^\bullet$  eher unwahrscheinlich.



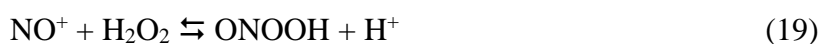
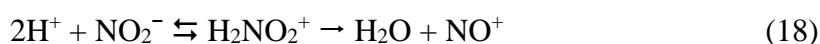
Zudem haben Winter *et al.*<sup>(36)</sup> gezeigt, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  bereits in der Plasmagasphase gebildet und von dort in die Flüssigkeit eingetragen wird.

Neben der oben aufgeführten und einzeln betrachteten RNS- und  $\text{OH}^\bullet$ -Chemie muss berücksichtigt werden, dass zahlreiche Kreuzreaktionen zwischen allen möglichen Reaktanten, Intermediaten und Produkten stattfinden können. So können  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{OH}^\bullet$  essentielle Edukte für weitere Reaktionen, wie zum Beispiel die Bildung von  $\text{NO}_3^-$  über eine sog. „Solvent cage“-Reaktion (s. Gleichung 17) des Isomers Peroxosalpetersäure ( $\text{ONOOH}$ ) oder die Kombination von zwei  $\text{OH}^\bullet$  Radikalen zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (s. Gleichung 1), sein<sup>(49)</sup>.



$\text{ONOOH}$  ist ein Isomer von  $\text{HNO}_3$  mit einer linearen Struktur, welches entsprechend Gleichung 17 bei einem  $\text{pH} < 7$  schnell zu  $\text{NO}_3^-$  isomeriert<sup>(25, 112)</sup>.

Es gibt noch einen zweiten möglichen Reaktionsweg, der zur Bildung von  $\text{ONOOH}$  führt.  $\text{NO}_2^-$ -Anionen reagieren im sauren Milieu mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und bilden über eine zweistufige Reaktion  $\text{ONOOH}$  (s. Gleichung 18-19)<sup>(23, 24, 28, 32, 49)</sup>.



Die Stabilität von  $\text{ONOOH}$  ist stark pH-abhängig. So ist das Molekül in einem basischen Milieu stabil. Bei einem physiologischen pH-Wert beträgt die Halbwertszeit von  $\text{ONOOH}$  wenige Sekunden, während in einem sauren Milieu der Zerfall mit einer höheren Reaktionsrate stattfindet<sup>(112)</sup>. In wässrigen Lösungen kann  $\text{ONOOH}$  auch in der nicht-protonierten Form als Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) vorliegen (s. Gleichung 20).



Da in dieser Arbeit alle Untersuchungen zur Inaktivierung von Mikroorganismen mit NaCl-Lösung durchgeführt wurden, müssen die gelösten Chloridionen ( $\text{Cl}^-$ ) als potentielle Reaktionspartner ebenfalls mit in die chemischen Vorgänge einbezogen werden. So kann das gelöste  $\text{Cl}^-$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur hypochlorigen Säure ( $\text{HOCl}$ ) reagieren<sup>(118)</sup>:



Ein weiterer Reaktionsweg zur Bildung von  $\text{HOCl}$  ist die Umsetzung von Wassermolekülen mit Natriumhypochlorid ( $\text{NaOCl}$ ), welches sich ebenfalls durch CAP-Behandlung in NaCl-Lösung bilden kann<sup>(119, 120)</sup>:



Aus  $\text{HOCl}$  kann in wässriger Lösung durch partielle Dissoziation (s. Gleichung 23) das Nebenprodukt Hypochlorit ( $\text{OCl}^-$ ) entstehen, welches entsprechend Gleichung 24 zu naszierendem Sauerstoff ( $\text{O}^*$ ) und Salzsäure zerfällt<sup>(120)</sup>.



Dass die plasmainduzierte Chlorid-Chemie in keinem Fall bei den chemischen Betrachtungen der Flüssigkeitschemie außer Acht gelassen werden sollte, zeigt ebenfalls die Arbeit von Wende *et al.*<sup>(121)</sup>.

Aus den gezeigten chemischen Reaktionen wird ersichtlich, dass sich die CAP-induzierte Flüssigkeitschemie, durch ihre einzelnen Komponenten und untereinander möglichen Kreuzreaktionen, komplex gestaltet. Viele der abgebildeten Reaktionen resultieren in antimikrobiell wirksamen Intermediaten bzw. Produkten. Daher werden nachfolgend die biologischen Wirkmechanismen der relevanten Moleküle genauer betrachtet und im Zusammenhang mit der Plasmapehandlung diskutiert.

### 5.4 Ausführungen zu den biologischen Wirkmechanismen plasmaassoziierter chemischer Moleküle

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Plasma bei Mikroorganismen und Säugetierzellen DNA- und Zellwandschäden induzieren kann, die auf oxidative bzw. nitrosative Prozesse zurückzuführen sind<sup>(23, 49, 122-127)</sup>. Viele der oben aufgeführten RNS und ROS sind Schlüsselmoleküle in oxidativen bzw. nitrosativen Stressreaktionen. So ist das  $\text{OH}^\bullet$  eines der reaktivsten



Sauerstoffspezies. Es verfügt über ein sehr starkes Oxidationsvermögen und greift durch sein freies ungepaartes Elektron leicht organische Substanzen an<sup>(49, 110, 128)</sup>.  $\text{OH}^\bullet$  ist äußerst reaktiv und toxisch für Mikroorganismen, da es unspezifische oxidative Schäden an vielen Zellstrukturen hervorruft<sup>(49)</sup>. Thiolgruppen ( $\text{R-SH}$ ) sowie Doppelbindungen von Proteinen und Lipiden werden von  $\text{OH}^\bullet$  oxidiert, wodurch deren Funktionsfähigkeit aufgehoben wird<sup>(49, 110, 128)</sup>.

Eine weitere wichtige antimikrobiell wirksame ROS ist das  $\text{H}_2\text{O}_2$ , das nach CAP-Behandlung innerhalb der flüssigen Phasen in Mengen nachgewiesen wurde, die normalerweise weit unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK; 2505 mg/l) liegen<sup>(28, 69)</sup>. Trotzdem sollen an dieser Stelle die keimreduzierenden Eigenschaften und Effekte von  $\text{H}_2\text{O}_2$  dargelegt werden.

$\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein starkes Oxidationsmittel, das bakterielle Proteine, Lipide und DNA-Moleküle oxidiert und chemisch verändert<sup>(129, 130)</sup>. Es führt über Peroxidationsreaktionen zu Rupturen an der äußeren und zytoplasmatischen Membran, wodurch diese ihre Integrität verlieren und für toxische Substanzen durchlässig werden können<sup>(131)</sup>. Dieser Effekt wird durch einen Synergismus zwischen  $\text{NO}^\bullet$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  potenziert<sup>(132, 133)</sup>. Dadurch steigert sich die Toxizität und Mutagenität des  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>(131, 134)</sup>. Mit reduzierter Membranintegrität treten vermehrt  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Moleküle ungehindert in die Zelle und reagieren mit intrazellulären Bestandteilen, wie DNA, Proteinen und Übergangsmetallen ( $\text{Cu}^+$  und/oder  $\text{Fe}^{2+}$ , via Fenton-Reaktion)<sup>(49, 135)</sup>. Aufgrund der nachweislich geringen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration innerhalb CAP-behandelter NaCl-Lösung wird dieses Molekül als alleiniges antibiotisch wirksames Agens ausgeschlossen. Es wirkt entweder im Synergismus mit anderen reaktiven Spezies oder dient als Edukt für die photolytische Spaltung zu  $\text{OH}^\bullet$  an der Flüssigkeitsoberfläche.

Neben den beschriebenen ROS weisen einige RNS ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften auf. So ist  $\text{NO}^\bullet$  ein sehr potenter antibiotisch wirksamer Reaktant. Es weist ein breites antimikrobielles Spektrum auf, das grampositive und gramnegative Bakterien einschließt<sup>(131)</sup>.  $\text{NO}^\bullet$  reagiert mit Biomolekülen der Zelloberfläche und induziert die Degeneration der Zellwand<sup>(131)</sup>. Die Zellwanddegeneration wird durch radikalische Lipidperoxidation verursacht und gilt als Hauptursache der zytotoxischen Effekte<sup>(49, 131)</sup>. Als ungeladenes Molekül diffundiert  $\text{NO}^\bullet$  ungehindert durch biologische Membranen und interagiert mit intrazellulären Bestandteilen<sup>(136)</sup>. Es bildet kovalente Bindungen mit DNA, Proteinen und Lipiden und ruft diverse intrazelluläre Schädigungen hervor<sup>(137)</sup>. Die DNA-schädigende Wirkung von  $\text{NO}^\bullet$  beruht auf einer Desaminierung von Desoxyribonukleotiden und auf Doppelstrangbrüchen, welche zu einem Arrest der Zellteilung führen<sup>(49, 131, 133)</sup>. Durch die Induktion von DNA-Schäden aktiviert  $\text{NO}^\bullet$  die SOS-Antwort in Prokaryoten. Dies ist ein genetisch gesteuertes DNA-Reparatursystem der Bakterienzelle, das der Zelle die Möglichkeit gibt, die geschädigte DNA zu reparieren und im

Anschluss den Zellzyklus fortzuführen<sup>(49, 134, 138)</sup>. Darüber hinaus mobilisiert NO• Zinkmoleküle (Zn<sup>2+</sup>) aus DNA-Bindungsproteinen<sup>(49, 133)</sup>. Dies führt zusätzlich zur Inhibition der DNA-Replikation<sup>(49, 133)</sup>. Die Zn<sup>2+</sup>-Mobilisation inhibiert die DNA-Reparaturenzyme DNA-Ligase und O<sup>6</sup>-methylguanin-DNA-methyltransferase in *E. coli*.<sup>(49, 133, 138)</sup> Damit sind die DNA-Schäden zu einem großen Teil irreversibel. Beide Enzyme sind essentiell für die Reparatur von mutagenen DNA-Läsionen, welche entweder natürlich, durch mutagene Substanzen, oder durch andere physikalisch-chemische Effekte hervorgerufen werden<sup>(49)</sup>. Proteinschäden werden durch Interaktionen mit einer Vielzahl von reaktiven Zentren, wie z.B. Hämgruppen, Sulfhydrylgruppen oder Aminen, induziert und unterbrechen damit den zellulären Metabolismus sowie lebenswichtige Transportvorgänge<sup>(131, 136)</sup>.

Neben dem NO• ist Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) ein weiteres stark antimikrobielles Agens und ein Schlüsselmolekül bei nitrosativen Stress<sup>(49)</sup>. Weiterhin ist es involviert in verschiedenen Krankheiten wie z.B. Arteriosklerose und entzündlichen Darmerkrankungen<sup>(25, 49)</sup>. ONOO<sup>-</sup> ist ein starkes Oxidationsmittel, welches mit Nukleophilen und Elektronenakzeptoren reagiert<sup>(139-142)</sup>. Es ist reaktiver und zytotoxischer als NO•, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> und ruft vielerlei oxidative Schäden hervor<sup>(143)</sup>.

Peroxynitrit verursacht DNA-Einzelstrangbrüche und oxidiert Basen der DNA, wodurch 8-Hydroxidesoxyguanosinmoleküle gebildet werden<sup>(143)</sup>. Die Reaktion von ONOO<sup>-</sup> mit Proteinen führt unter anderem zur Bildung von Carbonylproteinen und zur Oxidation von Tryptophan-, Tyrosin- und Cysteingruppen<sup>(141, 143)</sup>. Die Nitrierung von Tyrosin in *ortho*-Stellung gilt als Hauptreaktionsweg in der Protein-Peroxynitrit-Interaktion<sup>(144)</sup>. Über die reaktiven Gruppen der modifizierten Proteine werden mehrere Eiweißmoleküle quervernetzt und funktionslos. Es kann jedoch auch zur Proteindefragmentierung kommen<sup>(141)</sup>. Neben den DNA- und Proteinmodifizierenden Eigenschaften ist ONOO<sup>-</sup> ebenfalls in der Lage, Membranen über Lipidperoxidationsreaktionen zu oxidieren und deren Integrität herabzusetzen<sup>(139)</sup>. Auch die einfache Diffusion von Peroxynitrit durch Zellmembranen kann Kationenkanäle beschädigen und die semipermeable Durchlässigkeit der Membranen negativ beeinflussen<sup>(144)</sup>. Stoffwechselphysiologisch hat die Diffusion von ONOO<sup>-</sup> in die Zelle einen nachteiligen Effekt auf intrazelluläre Elektronentransporte und generell auf die Zellrespiration<sup>(144)</sup>. In saurem Milieu liegt ONOO<sup>-</sup> in seiner protonierten Form, der Peroxosalpetersäure (ONOOH), vor. Als ungeladenes Molekül kann ONOOH ungehindert die intakte semipermeable Membran passieren. In der Zelle herrscht ein physiologischer pH-Wert von ca. 7. Daher wird ONOOH nach der Passage durch die Membran in der Zelle zu ONOO<sup>-</sup> deprotoniert, welches wiederum ungehindert mit den unterschiedlichen Zellbestandteilen reagiert.

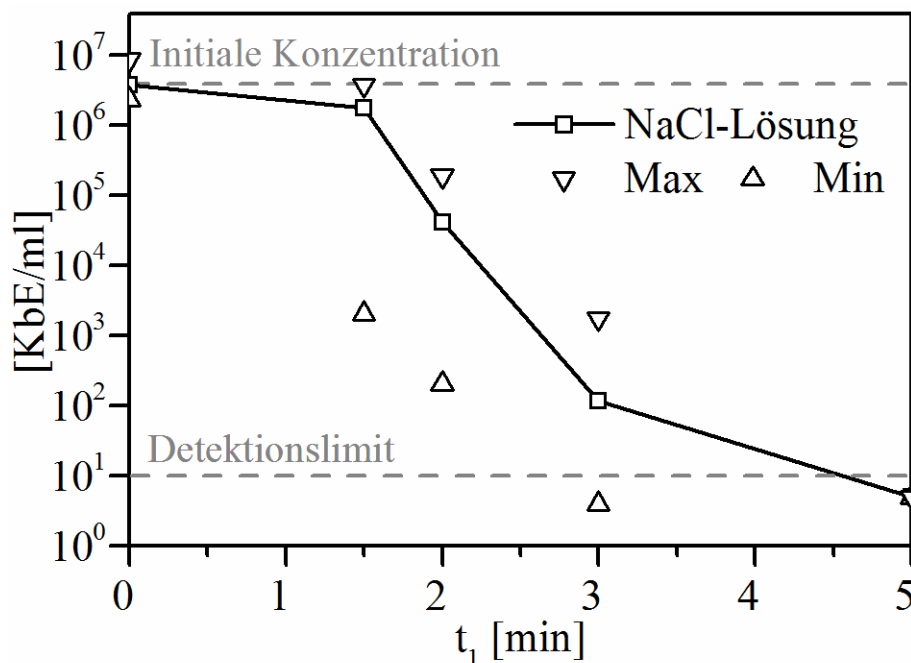
An dieser Stelle kann basierend auf den oben beschriebenen Ergebnissen und den theoretischen Herleitungen ein weiteres Zwischenfazit für die Flüssigkeitschemie gezogen werden. Da in dieser Arbeit hauptsächlich mit zwei DBE gearbeitet wurde, die beide  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Mengen unterhalb der MHK produzieren und für die epoxidharzbasierte DBE in einer reinen Argonatmosphäre keine antimikrobiellen Effekte nachgewiesen werden konnten<sup>(29)</sup>, kann davon ausgegangen werden, dass ROS nur eine untergeordnete Rolle bei den antimikrobiellen Plasmaeffekten spielen. Darüber hinaus steht in einer reinen Argonatmosphäre  $\text{N}_2$  als Ressource für die Bildung von RNS nicht zur Verfügung und diese werden daher nur in sehr geringen Mengen gebildet. Basierend auf dieser Tatsache können RNS, wie z.B.  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$  und  $\text{ONOOH}$ , mit ihren oxidativen Eigenschaften somit als potentielle Hauptverursacher von DNA-Schäden und Zellwanddegeneration in Betracht gezogen werden.

Neben der Identifizierung von reaktiven Spezies zeigen die hier dargelegten analytischen und mikrobiologischen Ergebnisse, wie wichtig die chemischen Prozesse in der flüssigen Phase für die antimikrobiellen Effekte von CAP sind und untermauern den aktuellen Stand der Wissenschaft, dass biologische Plasmaeffekte über das flüssige Medium auf die eukaryotische bzw. prokaryotische Zelle übertragen werden. Bereits in der Vergangenheit ergab sich daraus die Frage, ob die Technologie der DBE zur Herstellung von antimikrobiell wirksamen Flüssigkeiten verwendet werden kann<sup>(28)</sup>. Die Untersuchungen von Oehmigen *et al.*<sup>(28)</sup> und Traylor *et al.*<sup>(47)</sup> haben gezeigt, dass mit Hilfe von CAP Flüssigkeiten mit abklingender antimikrobieller Wirkung, sog. „plasmaaktivierte Flüssigkeiten“, erzeugt werden können. Aus diesem Grund greift der nachfolgende Abschnitt diese Thematik erneut auf und beschäftigt sich mit weiterführenden Fragestellungen, wie z.B. der Stabilität und Langzeitwirkung von plasmabehandelten Kochsalzlösungen.

## 5.5 Plasmabasierte Herstellung, Stabilisierung und Optimierung von antimikrobiell wirksamen Flüssigkeiten

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Bedeutung der flüssigen Phase für die biologischen Effekte diskutiert und ihr eine Schlüsselrolle zugeordnet. Daher soll in diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit die plasmabasierte Herstellung von antimikrobiell wirksamen NaCl-Lösungen mit Hilfe der keramikbasierten DBE sowie deren Stabilität systematisch analysiert und diskutiert werden. Die plasmabehandelte NaCl-Lösung (0,85 %) wurde entsprechend DIN EN 1040:2006-03<sup>(81)</sup> auf ihre bakterizide Wirkung untersucht. Die Testungen wurden in zwei Versuchsreihen durchgeführt. In der ersten Testserie wurde geprüft, welche Plasmabehandlungszeiten ( $t_1$ , min) benötigt werden, um 5 ml antimikrobiell wirksame NaCl-Lösung zu

generieren. Die Einwirkzeit ( $t_3$ ) der plasmabehandelten NaCl-Lösung auf die Mikroorganismen in Suspension betrug hierbei 15 min. Abbildung 46 zeigt die Vitalität von *E. coli* (KbE/ml) in CAP-behandelter NaCl-Lösung in Abhängigkeit von der Plasmabehandlungszeit  $t_1$  (min). Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben. Deutliche Hemmungen im bakteriellen Wachstum sind nach 2-5 min CAP-Behandlung nachweisbar. Bei einer initialen Konzentration von ca.  $10^6$ - $10^7$  KbE/ml wird die maximale Reduktionsrate von 6  $\log_{10}$ -Stufen nach 5 min Behandlung erreicht. Die gezeigten Ergebnisse stimmen mit den von Oehmigen *et al.*<sup>(28)</sup> durchgeführten Untersuchungen überein. Weiterführend zu dieser Studie wurde mit der zweiten Versuchsreihe getestet, welchen Einfluss die Einwirkzeit bzw. Kontaktzeit ( $t_3$ , min) auf die antimikrobiellen Eigenschaften von CAP-behandelter NaCl-Lösung hat. Hierfür wurde eine letale Behandlungszeit der Flüssigkeit ( $t_1 = 5$  min; vgl. Abbildung 46) gewählt und die Einwirkzeit auf die Mikroorganismen ( $t_3 = 1$ -15 min) variabel gehalten.



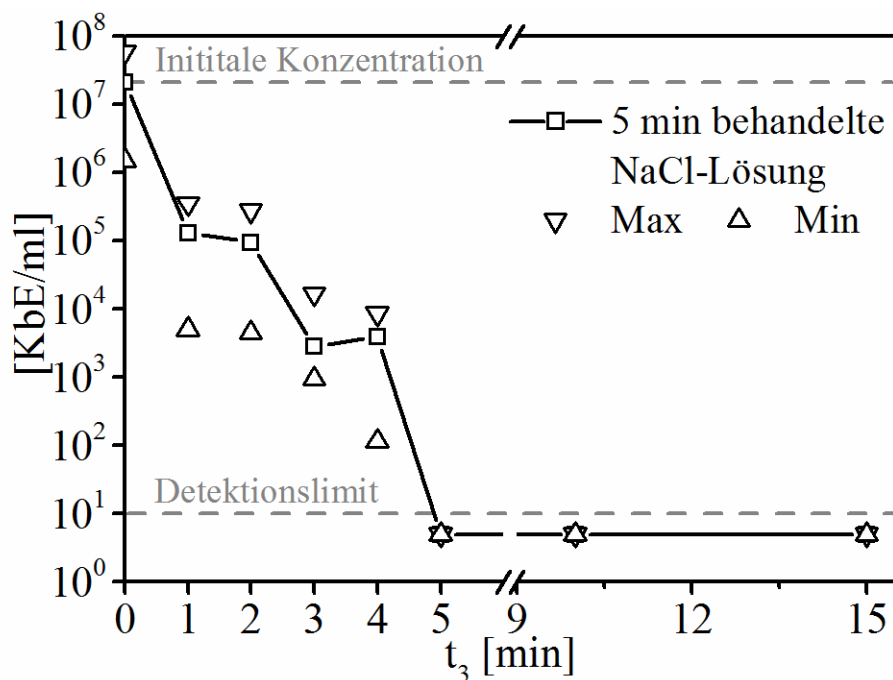
**Abbildung 46:** Vitalität von *E. coli* in CAP-behandelter NaCl-Lösung in Abhängigkeit von der Plasmabehandlungszeit der Flüssigkeit ( $t_1$ ). Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben.

In Abbildung 47 ist für die 5 min CAP-behandelte NaCl-Lösung die Anzahl der nach der Inkubation mit den *E. coli* verbleibenden KbE/ml in Abhängigkeit von der Einwirkzeit ( $t_3$ ) dargestellt. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander

durchgeführten Experimenten. Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben.

Bei einer Ausgangskonzentration von ca.  $10^7$ - $10^8$  KbE/ml nimmt die Anzahl der überlebenden Kolonien kontinuierlich mit zunehmender Einwirkzeit ab. Das Detektionslimit wird bereits nach einer Kontaktzeit von 5 min erreicht, d.h. eine 5 min plasmabehandelte NaCl-Lösung führt nach 5 min Kontakt mit *E. coli* zu einer Bakterienreduktion um  $> 7 \log_{10}$ -Stufen. Daher wurde in den nachfolgenden Versuchen die minimale Einwirkzeit von 5 min nicht unterschritten.

Nach den im vorangegangenen Abschnitt (5.3) dargelegten Hypothesen zu chemischen Prozessen in plasmabehandelter Flüssigkeit münden die beschriebenen Reaktionen in zum Teil sehr kurzlebigen reaktiven Intermediaten, wie zum Beispiel  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  und  $\text{OH}^\bullet$ . Sollten diese Moleküle für die bakterizide Wirkung verantwortlich sein, dann müssten die antimikrobiellen Effekte von CAP-behandelter NaCl-Lösung nur für kurze Zeit nachweisbar sein. Die zeitlich begrenzte Wirksamkeit von CAP-behandelter Lösung wurde bereits von Oehmigen *et al.*<sup>(28)</sup> untersucht, wobei gezeigt wurde, dass die antimikrobielle Wirkung einer plasmabehan-



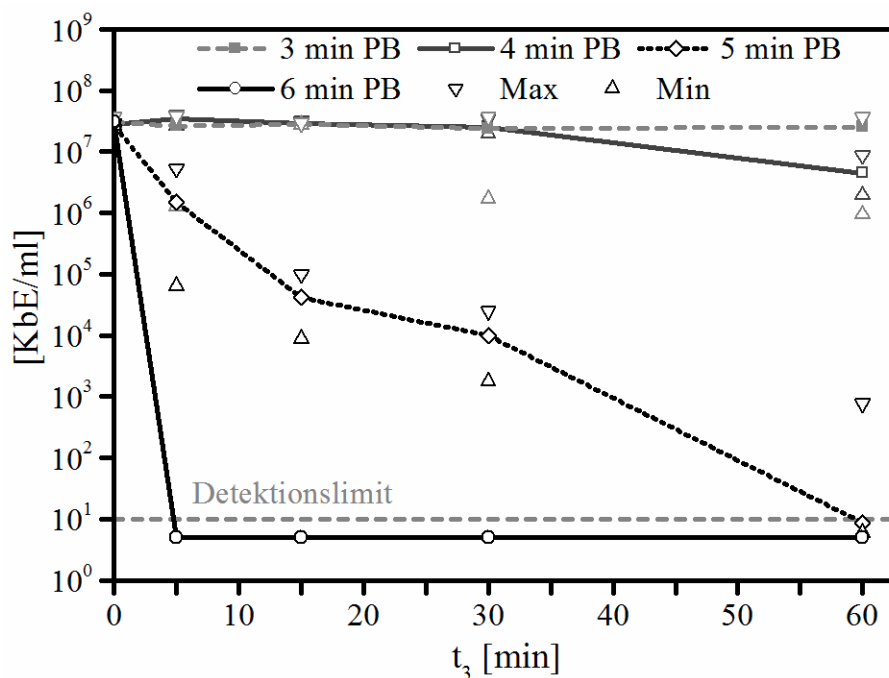
**Abbildung 47:** Relevanz der Einwirkzeit auf die Mikroorganismen ( $t_3$ , min) auf die keimreduzierende Wirkung von NaCl-Lösung nach 5 min CAP-Behandlung. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben.

delten NaCl-Lösung nach 30 min in abgeschwächter Form noch vorhanden war<sup>(28)</sup>. Mit zunehmender CAP-Behandlungszeit der NaCl-Lösung wurde sogar eine zunehmend länger

anhaltende bakterizide Wirkung beobachtet<sup>(28, 47)</sup>. Daraus ergaben sich die nachfolgenden Fragestellungen:

1. Lässt sich die bakterizide Wirkung von CAP-behandelter NaCl-Lösung mit der DBE durch eine Verlängerung der Behandlungszeit stabilisieren?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen chemischer Zusammensetzung und antimikrobieller Langzeitwirkung?

Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen, wurden je 5 ml NaCl-Lösung für 3-6 min mit der DBE behandelt. Nach einer Wartezeit ( $t_2$ ) von 30 min wurden die Proben mit *E. coli* beimpft. Die Einwirkzeit ( $t_3$ ) auf die Bakterien wurde dabei systematisch variiert, um die Relevanz der Kontaktzeit einzuschätzen. Abbildung 48 zeigt die Vitalität von *E. coli* in 3-6 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen nach 30 min Wartezeit ( $t_2$ ) in Abhängigkeit von der Einwirkzeit auf die Mikroorganismen ( $t_3$ ). Dargestellte Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Streuungen um den Mittelwert sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben.



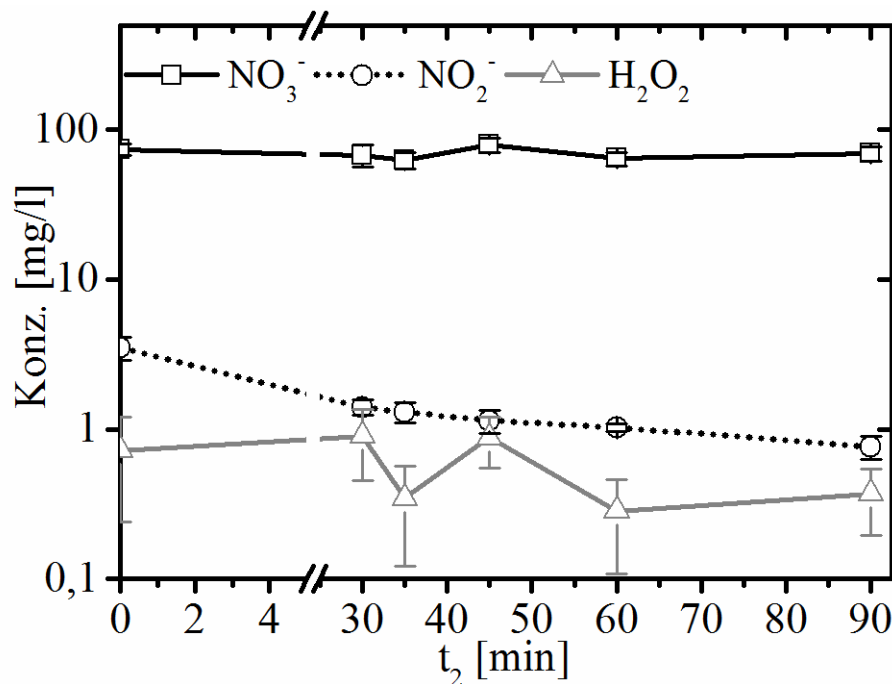
**Abbildung 48:** Vitalität von *E. coli* in 3-6 min CAP-behandelter NaCl-Lösung nach 30 min Wartezeit in Abhängigkeit von der Einwirkzeit ( $t_3$ )<sup>(49)</sup>. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben.

Kurze Plasmabehandlungszeiten von drei und vier Minuten zeigen nach 30 min Wartezeit nahezu keine bakterizide Wirkung. Eine deutliche Reduktion im bakteriellen Wachstum zeigt sich

aber nach 5 min Plasmabehandlungszeit. Die bakterizide Wirkung kann kontinuierlich durch eine Verlängerung der Einwirkzeit bis unter die Nachweisgrenze gesteigert werden. Nur bei einer Plasmabehandlungszeit von 6 min zeigt sich nach 30 min Wartezeit eine deutliche Reduktion der Bakterienzahl bis unter die Nachweisgrenze mit nur 5 min Einwirkzeit. Die anfänglich starke bakterizide Wirkung von 3-5 min CAP-behandelter NaCl-Lösung, welche direkt nach der Plasmabehandlung nachgewiesen wird (s. Abbildung 46), kann nach 30 Minuten Wartezeit nicht mehr gezeigt werden, d.h. es kommt zu einem zeitabhängigen Abklingen der antimikrobiellen Wirkung der plasmabehandelten NaCl-Lösungen, wie es auch/bereits in einem Einzelbeispiel von Oehmigen *et al.*<sup>(28)</sup> demonstriert wurde. Jedoch können die antimikrobiellen Effekte plasmabehandelter NaCl-Lösungen über eine Verlängerung der Plasmabehandlungszeit bzw. der Einwirkzeit auf die Mikroorganismen verstärkt werden. Die initial stark keimreduzierenden Eigenschaften können daher mit kurzlebigen reaktiven Spezies, wie zum Beispiel NO, NO<sup>+</sup>, NO<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup> und OH<sup>•</sup>, begründet werden<sup>(49)</sup>.

Die beobachtete Langzeitaktivität von 5 min bzw. 6 min CAP-behandelter NaCl-Lösung muss demzufolge allerdings auf mindestens eine stabile reaktive Spezies zurückzuführen sein, die innerhalb der wässrigen Phase nach mindestens fünf Minuten CAP-Behandlung in antimikrobiell wirksamen Konzentrationen generiert wird. Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen wurden Flüssigkeitsanalysen an 4 und 5 min CAP-behandelter NaCl-Lösung durchgeführt. Die Wahl bzgl. der beiden Behandlungszeiten begründete sich auf der Tatsache, dass 4 min behandelte NaCl-Lösungen nahezu keine antimikrobielle Langzeitaktivität aufwiesen, während Proben, die 5 min behandelt wurden, erste anhaltende Effekte zeigten (vgl. Abbildung 48). Die Flüssigkeitsanalyse beinhaltet die Ermittlung der NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen sowie die Bestimmung der pH-Werte. Bei beiden Behandlungszeiten zeigte sich, dass die pH-Werte von 2,6 (4 min CAP) und 2,7 (5 min CAP) über die gesamte Wartezeit (t<sub>2</sub>) von mindestens 60 min konstant bleiben (Werte nicht dargestellt). Abbildung 49 zeigt die NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen von 4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen in Abhängigkeit von der Wartezeit (t<sub>2</sub>), während in Abbildung 50 die NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 5 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen in Abhängigkeit von der Wartezeit (t<sub>2</sub>) dargestellt sind. Die hier verwendeten Wartezeiten 0, 35, 45, 60 und 90 min wurden in Anlehnung an die durchgeführten biologischen Langzeitversuche ausgewählt. Die angegebenen Zeiten ergeben sich aus der Wartezeit von 30 min plus der jeweiligen CAP-Behandlungszeit (30 min + t<sub>1</sub>). Gezeigte Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Sowohl NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werden durch 4 bzw. 5 min CAP-Behandlung in annähernd gleichen initialen Konzentrationen von ca. 100 mg/l (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und ca.

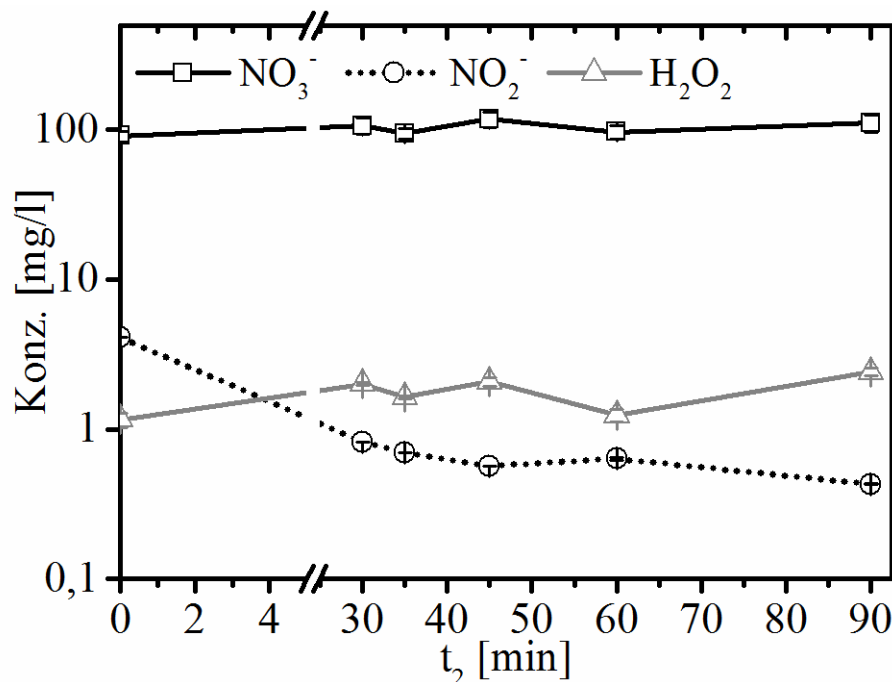
1 mg/l ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gebildet. Die Konzentrationen von  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  blieben über die erfassten 90 min Wartezeit weitestgehend stabil, wobei in den 4 min behandelten NaCl-Lösungen stärkere Schwankungen bei der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration auftraten, ohne jedoch einen abfallenden Trend erkennen zu lassen. Das einzige nachweisbare instabile Molekül ist  $\text{NO}_2^-$ , dessen Konzentration deutlich innerhalb der ersten 30 min abfiel. Bemerkenswert ist hierbei, dass sowohl 4 als auch 5 min CAP-Behandlung der NaCl-Lösung zu einer annähernd gleichen initialen  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration von ca. 7 mg/l führen. Jedoch trat ein stärkerer Abfall der  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration in den 5 min CAP-behandelten Proben auf. Dadurch reduziert sich in diesem Fall die  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration auf Werte unterhalb der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in der Lösung. Bei 4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen lag die  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration auch nach 90 min Wartezeit noch oberhalb der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration. Der offenbar schnellere Zerfall von  $\text{NO}_2^-$  in fünf Minuten CAP-behandelten Proben könnte durch die länger anhaltende UV-Strahlung auf die NaCl-Lösung, die insgesamt längere Plasmabehandlungszeit und den damit verbundenen höheren Energieeintrag begründet werden<sup>(49)</sup>. Ein Energietransfer auf  $\text{NO}_2^-$  kann die Kinetik des Zerfalls beschleunigen<sup>(49)</sup>. Er kann aber auch auf Reaktionen zwischen anderen Molekülen zurückzuführen sein, die wiederum den Abbau von  $\text{NO}_2^-$  begünstigen<sup>(49)</sup>.



**Abbildung 49:** Chemische Zusammensetzung von 4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen (pH = 2,7). Die Mittelwerte der  $\text{NO}_2^-$ -,  $\text{NO}_3^-$ - und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen sind in Abhängigkeit von der Wartezeit ( $t_2$ ) wiedergegeben. Streuungen sind als Standardabweichungen angegeben<sup>(49)</sup>. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben.



Die etwas höhere  $\text{NO}_3^-$ -Konzentration nach 5 min CAP-Behandlung hat ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität von  $\text{NO}_2^-$ . Der pH-Wert der NaCl-Lösungen wird maßgeblich von diesem Molekül bestimmt und in den sauren Bereich verschoben<sup>(49, 54, 69)</sup>. Der Zerfall von  $\text{NO}_2^-$  über die Reaktionen entsprechend den Gleichung 5-8 ist zudem sehr stark abhängig vom sauren pH-Wert der Lösung<sup>(49)</sup>. Beim Abfall des pH-Wertes steigert sich die Kinetik der dargestellten Reaktionen. Daher kann der höhere Energieeintrag in Kombination mit dem etwas geringeren pH-Wert den schnelleren Zerfall von  $\text{NO}_2^-$  in fünf Minuten CAP-behandelten NaCl-Lösungen begründen.



**Abbildung 50:** Chemische Zusammensetzung von 5 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen (pH = 2,6). Die Mittelwerte der  $\text{NO}_2^-$ -,  $\text{NO}_3^-$ - und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen sind in Abhängigkeit von der Wartezeit ( $t_2$ ) wiedergegeben. Streuungen sind als Standardabweichungen angegeben<sup>(49)</sup>. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben.

Die chemischen Prozesse in den NaCl-Lösungen lassen sich mit den angeführten Überlegungen sehr gut erklären, während die beobachteten antimikrobiellen Langzeiteffekte (s. Abbildung 48) eher im Widerspruch dazu stehen. Im vorangegangenen Abschnitt 5.2 wurde den RNS und ROS eine unterschiedlich starke Relevanz für die keimreduzierende Wirkung von CAP zugeordnet. RNS spielen bei der Inaktivierung von Bakterien eine maßgebliche Rolle. Um eine Erklärung für die hier gezeigte widersprüchliche Korrelation zwischen chemischer Zusammensetzung und antimikrobiellen Effekt herzuleiten, wurden die Konzentrationsverhältnisse von  $\text{NO}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den verschiedenen plasmabehandelten NaCl-Lösungen genauer betrachtet. Für einen präziseren Vergleich zwischen den beiden Behandlungszeiten wurden zunächst die

molaren Konzentrationen von  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  ermittelt und im Anschluss zueinander ins Verhältnis gesetzt. Für NaCl-Lösungen, die für 4 und 5 min ( $t_1$ ) mit CAP behandelt wurden, fasst Tabelle 18 die Verhältnisse der Konzentrationen von  $\text{NO}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei unterschiedlichen Wartezeiten ( $t_2$ ) nach Plasmabehandlung zusammen.

Direkt nach der CAP-Behandlung ( $t_2 = 0$ ) ist bei beiden Behandlungszeiten ( $t_1 = 4$  und 5 min) der  $\text{NO}_2^-$ -Anteil in den NaCl-Lösungen deutlich höher als der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anteil. Bereits nach einer Wartezeit von 30 min zeigte sich jedoch ein deutlicher Unterschied in den  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$  Verhältnissen. Bei  $t_1 = 4$  min ist der  $\text{NO}_2^-$ -Anteil bei fast allen Wartezeiten ( $t_2 = 0-90$  min) größer als

**Tabelle 18:** Verhältnisse der Konzentrationen von  $\text{NO}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  in NaCl-Lösung, nach 4 bzw. 5 min CAP-Behandlung ( $t_1$ ), bei unterschiedlichen Wartezeiten ( $t_2$ )<sup>(49)</sup>.

$t_2$ [min]	Verhältnis der Konzentrationen $\text{NO}_2^- : \text{H}_2\text{O}_2$	
	$t_1 = 4$ min	$t_1 = 5$ min
0	3,7 : 1	2,6 : 1
30	1,2 : 1	1 : 2
35	3,3 : 1	1 : 3,1
45	1 : 1	1 : 4,7
60	2,5 : 1	1 : 2,7
90	1,5 : 1	1 : 8,1

der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anteil. Die einzige Ausnahme zeigt sich bei einer Wartezeit von 45 min, bei der sich das Verhältnis zwischen  $\text{NO}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Waage hält. Im Vergleich dazu zeigte sich für  $t_1 = 5$  min, dass sich das  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ -Verhältnis bereits nach 30 min Wartezeit zu Gunsten des  $\text{H}_2\text{O}_2$  verschiebt. Innerhalb von 90 min nimmt die  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration soweit ab, dass der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Anteil relativ auf das 8,1-fache ansteigt. Dieser Überschuss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gegenüber  $\text{NO}_2^-$  lässt eine erste Schlussfolgerung bzgl. der antimikrobiellen Langzeiteffekte von 5 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen zu. In Kapitel 3.2 wurde gezeigt, dass die antimikrobiellen Effekte nicht ausschließlich auf ROS beruhen, ROS aber möglicherweise eine notwendige unterstützende Rolle spielen. Diese Annahme wird an dieser Stelle anhand des Nitrit-/Wasserstoffverhältnisses bestätigt. Die toxischen Eigenschaften des  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden unter Abschnitt 5.4 bereits angeführt<sup>(49, 129, 130, 132, 135)</sup>. Jedoch liegt auch in diesem Fall die gemessene Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  weit unterhalb der MHK (2505 mg/l). Daher kann  $\text{H}_2\text{O}_2$  auch im Fall der Langzeitwirkung von CAP-behandelten NaCl-Lösungen keine direkte antimikrobielle Wirkung zugesprochen werden. Trotzdem spielt es offenbar eine deutliche, unterstützende Rolle für die Wirkung von RNS. Somit sind auch hier beide Spezies, ROS und RNS, für die Inaktivierung in plasmabehandelten Flüssigkeiten erforderlich. Spezifische Aussagen über die Identität der zumindest für eine gewisse Zeit in der Flüssigkeit stabilen reaktiven Spezies lassen sich anhand der

vorliegenden Daten jedoch nicht treffen. Daher kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, dass, wie oben beschrieben,  $\text{H}_2\text{O}_2$  im sauren Milieu mit  $\text{NO}_2^-$  zu Peroxosalpetersäure (ONOOH) (s. Gleichung 18-19) reagiert, welche für ihre keimreduzierenden Eigenschaften bekannt ist<sup>(145)</sup>. Höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen gegenüber  $\text{NO}_2^-$  könnten die Bildung von ONOOH begünstigen<sup>(49)</sup>.

Diese Annahme benötigt jedoch weiterführende Untersuchungen, die sowohl die Reaktionsrate wie auch das Reaktionsgleichgewicht miteinschließen. Neben den rein chemischen Reaktionen sollten auch metabolische Prozesse in *E. coli* als potentielle Ursache für die antimikrobiellen Kurz- und Langzeiteffekte in Betracht gezogen werden. Durch solche metabolischen Prozesse ist *E. coli* zum Beispiel mit Hilfe membrangebundener Proteine im Periplasma, den sog. Nitratreduktasen, in der Lage,  $\text{NO}_3^-$  auch in Gegenwart von Sauerstoff zu  $\text{NO}_2^-$  zu reduzieren<sup>(146)</sup>. Dieser Prozess ist unter neutralen Umgebungsbedingungen harmlos und dient neben der Atmungskette der zellulären Energiegewinnung. Jedoch haben Wilks und Slonczewski im Jahr 2007 gezeigt, dass der periplasmatische pH-Wert dem extrazellulären (pH-Wert) gleicht<sup>(111)</sup>. Wird dieser Aspekt in die Betrachtungen mit einbezogen, könnte davon ausgegangen werden, dass der CAP-induzierte pH-Abfall in den NaCl-Lösungen auch zu einer Verschiebung des periplasmatischen pH-Wertes in den sauren Bereich führt. In diesem Fall würde die  $\text{NO}_3^-$ -Reduktion über Nitratreduktasen zur Bildung von sogenannten sauren Nitriten führen, welche in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  stark antimikrobielle Eigenschaften aufweisen<sup>(147)</sup>. Dieser metabolische Prozess könnte eine mögliche Erklärung für die gefundenen antimikrobiellen Langzeiteffekte sein. Da das Periplasma die erste und damit wichtigste Abwehr von gramnegativen Bakterien gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen darstellt, sollten das Periplasma und die entsprechenden metabolischen Prozesse bei zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden. Weiterführende Arbeiten, die diese Aspekte beinhalten, werden daher zur Aufklärung von CAP-induzierten antimikrobiellen Mechanismen dienlich sein.

Die in diesem Abschnitt 5.5 dargestellten Versuche zeigen, dass mittels CAP antimikrobiell aktive NaCl-Lösungen mit Kurz- und Langzeitwirkung hergestellt werden können. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Kurz- und Langzeitwirkung mit einer chemischen Änderung der flüssigen Phase einhergehen. Die hier dargelegten Überlegungen zeigen, dass eine Vielzahl von chemischen Reaktionen für die keimreduzierende Wirkung verantwortlich sein können. Zudem wurden metabolische Prozesse, die im Periplasma von *E. coli* theoretisch ablaufen können, als mögliche Ursache für die antimikrobiellen Effekte in Betracht gezogen.

Der genaue Wirkmechanismus ist bis jetzt noch nicht bekannt. Vermutlich ist es ein Zusammenspiel zwischen den unter 5.3 angeführten Agenzien sowie evtl. zellulär ablaufenden Prozessen. Letzteres sollte mit Hilfe der Genexpressionsanalyse weiter untersucht werden

## 5.6 Microarraybasierte Genexpressionsanalyse

Im vorangegangenen Abschnitt 5.5 wurde darüber berichtet, dass mittels CAP antimikrobiell aktive NaCl-Lösungen hergestellt werden können, die über eine bakterizide Kurz- und Langzeitwirkung bei Raumtemperatur verfügen. Für die weitere Aufklärung der Wirkungsmechanismen auf molekularbiologischer Ebene wird nun ein tieferes Verständnis der zellulären Mechanismen benötigt. Dies sollte mit Hilfe der Genexpressionsanalyse erzielt werden.

Eine microarraybasierte Genexpressionsanalyse wurde an *E. coli* nach direkter und indirekter CAP-Behandlung durchgeführt, um über die Identifizierung von zellulären Antworten der Mikroorganismen Rückschlüsse auf mögliche Wirkungsmechanismen zu ziehen. In Tabelle 19 wurde eine Auswahl von Genen, deren Expressierung durch direkte und indirekte CAP-Behandlung verändert wurde, mit ihren entsprechenden Funktionen zusammengefasst und in unterschiedliche Gruppen eingeordnet. Die Kategorisierung erfolgte, analog zu Sharma *et al.*<sup>(148)</sup> und Joshi *et al.*<sup>(149)</sup>, entsprechend ihrer zellulären Funktion, wie z.B. oxidativer Stress, SOS-Antwort, nitrosativer Stress, Stoffwechsel, Transporter usw.. Die dargestellten Expressionen sind relativ zur unbehandelten Kontrolle. Angegeben ist der Faktor, um den die veränderten Gene im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hoch- bzw. herunter reguliert wurden. Die Funktion der aufgelisteten Gene wurde mit Hilfe der, für das Bakterium *E. coli* K-12 MG1655, öffentlich zugängigen EcoCyc-Datenbank ([www.ecocyc.org](http://www.ecocyc.org)) einzeln zugeordnet. Die englischen Bezeichnungen entsprechen der international anerkannten Nomenklatur und wurden daher in dieser Arbeit übernommen.

**Tabelle 19:** Liste der unterschiedlich exprimierten Gene in *E. coli* nach direkter und indirekter CAP-Behandlung. Angegeben ist der Faktor, um den das entsprechende Gen hoch- (+) bzw. herunter (-) reguliert ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowie die kodierte Funktion.

SOS-Antwort			
Gen	Direkt	Indirekt	Funktion
<i>umuD</i>	+ 25,3	+ 28,0	DNA polymerase V, subunit D
<i>recA</i>	+ 42,6	+ 97,0	DNA strand exchange and recombination protein with protease and nuclease activity
<i>recR</i>	+ 44,0	+ 118,0	gap repair protein
<i>recN</i>	+ 119,0	+ 79,0	recombination and repair protein

<i>recB</i>	+ 9,0	+ 19,0	exonuclease V (RecBCD complex), beta sub-unit
<i>recC</i>	+ 15,0	+ 18,0	exonuclease V (RecBCD complex), gamma chain
<i>sulA</i>	+ 54,0	+ 60,0	SOS cell division inhibitor
<i>dinF</i>	+ 7,8	+ 16,0	DNA-damage-inducible SOS response protein
<i>dinI</i>	+ 15,0	+ 27,0	DNA damage-inducible protein I
<i>dinG</i>	+ 39,0	+ 78,0	ATP-dependent DNA helicase
<i>yebG</i>	+ 39,0	+ 74,0	conserved protein regulated by LexA
<i>yebK</i>	+ 20,0	+ 32,0	predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>sbmC</i>	+ 120,0	+ 110,0	DNA gyrase inhibitor
<i>uvrA</i>	+ 23,0	+ 75,0	ATPase and DNA damage recognition protein of nucleotide excision repair excinuclease UvrABC
<i>uvrB</i>	+ 68,0	+ 173,0	excinuclease of nucleotide excision repair, DNA damage recognition component
<i>lexA</i>	+ 119,0	+ 200,0	DNA-binding transcriptional repressor of SOS regulon
<i>Ssb</i>	+ 85,0	+ 76,0	single-stranded DNA-binding protein
<i>Nfo</i>	+ 9,0	+ 15,0	endonuclease IV with intrinsic 3'-5' exonuclease activity
<i>uvrC</i>	+ 5,5	-1,5	excinuclease UvrABC, endonuclease subunit
<i>uvrD</i>	+ 2,7	-2,1	DNA-dependent ATPase I and helicase II
<b>Oxidativer und nitrosativer Stress</b>			
<b>Gen</b>	<b>Direkt</b>	<b>Indirekt</b>	<b>Funktion</b>
<i>katG</i>	+ 69,0	+ 180,0	catalase/hydroperoxidase HPI(I)
<i>katE</i>	+ 55,0	+ 99,0	hydroperoxidase HPII(III) (catalase)
<i>sodB</i>	+ 93,0	+ 124,0	superoxide dismutase, Fe
<i>sodA</i>	+ 172,0	+ 188,0	superoxide dismutase, Mn
<i>soxR</i>	+ 9,0	+ 22,0	DNA-binding transcriptional dual regulator, Fe-S center for redox-sensing

<i>soxS</i>	+ 105,0	+ 153,0	DNA-binding transcriptional dual regulator
<i>ahpF</i>	+ 7,0	+ 32,0	alkyl hydroperoxide reductase, F52a subunit, FAD/NAD(P)-binding
<i>ahpC</i>	+ 61,0	+ 121,0	alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit
<i>trxA</i>	+ 45,0	+ 70,0	thioredoxin 1
<i>trxB</i>	+ 26,0	+ 59,0	thioredoxin reductase, FAD/NAD(P)-binding
<i>mntH</i>	+ 64,0	+ 38,0	manganese/divalent cation transporter
<b>Transporter</b>			
<b>Gen</b>	<b>Direkt</b>	<b>Indirekt</b>	<b>Funktion</b>
<i>fhuC</i>	+ 21,0	+ 61,0	iron-hydroxamate transporter subunit
<i>fhuA</i>	+ 61,0	+ 101,0	ferrichrome outer membrane transporter
<i>fhuF</i>	+ 65,0	+ 121,0	ferric iron reductase involved in ferric hydroxamate transport
<i>lsrA</i>	+ 52,0	+ 99,0	fused AI2 transporter subunits of ABC superfamily: ATP-binding components
<i>lsrC</i>	+ 65,0	+ 127,0	AI2 transporter
<i>glnH</i>	+ 235,0	+ 72,0	glutamine transporter subunit
<i>proY</i>	+ 10,0	+ 16,0	predicted cryptic proline transporter
<i>proP</i>	+ 37,0	+ 88,0	proline/glycine betaine transporter
<i>narU</i>	- 4,8	- 5,7	nitrate/nitrite transporter
<i>mdtL</i>	+ 5,2	- 2,2	multidrug efflux transporter MdtL
<i>mdtJ</i>	+ 4,1	- 3,3	multidrug efflux system transporter
<i>mdtE</i>	+ 3,0	- 4,1	multidrug resistance efflux transporter
<i>mdtD</i>	+ 2,0	- 3,7	multidrug resistance efflux transporter
<i>mdtF</i>	+ 2,0	- 2,8	multidrug transporter, RpoS-dependent
<b>Nitratreduktion und Nitratatmung</b>			
<b>Gen</b>	<b>Direkt</b>	<b>Indirekt</b>	<b>Funktion</b>
<i>Had</i>	+ 14,0	+ 86,0	ATPase regulatory factor involved in DnaA inactivation

<i>napF</i>	+ 7,0	+ 19,0	ferredoxin-type protein, predicted role in electron transfer to periplasmic nitrate reductase (NapA)
<i>napA</i>	+ 1,5	+ 2,8	Nitrate reductase, periplasmic
<i>napD</i>	- 5,4	+ 2,6	Assembly protein for periplasmic nitrate reductase
<i>narQ</i>	- 2,4	+ 2,1	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with NarP (NarL)
<i>narG</i>	- 1,1	+ 6,1	nitrate reductase 1, alpha subunit
<i>narV</i>	- 5,3	- 7,1	Respiratory nitrate reductase 2 gamma chain
<i>narU</i>	- 4,8	- 5,7	nitrate/nitrite transporter
<i>narW</i>	- 4,7	- 5,7	cryptic nitrate reductase 2, delta subunit, assembly function
<i>narY</i>	- 4,4	- 4,9	Respiratory nitrate reductase 2 beta chain
<i>narI</i>	- 4,4	- 4,6	nitrate reductase 1, gamma (cytochrome b(NR)) subunit
<i>narZ</i>	- 8,9	- 3,0	nitrate reductase 2 (NRZ), alpha subunit
<i>narJ</i>	- 3,0	- 2,0	molybdenum-cofactor-assembly chaperone subunit (delta subunit) of nitrate reductase 1
<i>narL</i>	- 2,4	- 2,6	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with NarX (or NarQ)
<i>narH</i>	- 2,3	+ 4,5	nitrate reductase 1, beta (Fe-S) subunit
<i>nirB</i>	- 2,3	+ 2,8	nitrite reductase, large subunit, NAD(P)H-binding
<b>andere mit Stress in Verbindung stehende Gene</b>			
<b>Gen</b>	<b>Direkt</b>	<b>Indirekt</b>	<b>Funktion</b>
<i>smpA</i>	+ 54,0	+ 45,0	small membrane lipoprotein
<i>smpB</i>	+ 10,0	+ 37,0	trans-translation protein
<i>frmA</i>	+ 32,0	+ 73,0	alcohol dehydrogenase class III/glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase

Regulatorische Gene			
Gen	Direkt	Indirekt	Funktion
<i>lsrR</i>	+ 25,0	+ 58,0	lsr operon transcriptional repressor
<i>cob</i>	+ 24,0	+ 54,0	deacetylase of acetyl-CoA synthetase, NAD-dependent
<i>paaX</i>	+ 83,0	+ 92,0	DNA-binding transcriptional repressor of phenylacetic acid degradation, aryl-CoA responsive
<i>mall</i>	+ 8,0	+ 26,0	DNA-binding transcriptional repressor
<i>uxuR</i>	+ 8,0	+ 23,0	DNA-binding transcriptional repressor
Stoffwechsel			
Gen	Direkt	Indirekt	Funktion
<i>poxB</i>	+ 32,0	+ 83,0	pyruvate dehydrogenase (pyruvate oxidase), thiamin-dependent, FAD-binding
<i>fdoH</i>	+ 83,0	+ 51,0	formate dehydrogenase-O, Fe-S subunit
<i>fdoI</i>	+ 198,0	+ 95,0	formate dehydrogenase-O, cytochrome b556 subunit
<i>uxaA</i>	+ 13,0	+ 55,0	altronate hydrolase
<i>uxaB</i>	+ 15,0	+ 123,0	altronate oxidoreductase, NAD-dependent
<i>uxaC</i>	+ 16,0	+ 64,0	uronate isomerase
<i>fdoH</i>	+ 83,0	+ 51,0	formate dehydrogenase-O, Fe-S subunit
<i>deoB</i>	+ 74,0	+ 158,0	phosphopentomutase
<i>sucC</i>	+ 85,0	+ 56,0	succinyl-CoA synthetase, beta subunit
<i>ribC</i>	+ 32,0	+ 78,0	riboflavin synthase, alpha subunit
<i>hisC</i>	+ 17,0	+ 26,0	histidinol-phosphate aminotransferase
<i>nagK</i>	+ 20,0	+ 32,0	N-acetyl-D-glucosamine kinase
<i>sseB</i>	+ 39,0	+ 31,0	rhodanase-like enzyme, sulfur transfer from thiosulfate
<i>hyaC</i>	+ 32,0	+ 115,0	hydrogenase 1, b-type cytochrome subunit



<i>fadR</i>	+ 102,0	+ 197,0	DNA-binding transcriptional dual regulator of fatty acid metabolism
<i>nrdA</i>	+ 15,0	+ 53,0	ribonucleoside diphosphate reductase 1, alpha subunit
<i>nrbB</i>	+ 20,0	+ 51,0	ribonucleoside diphosphate reductase 1, beta subunit, ferritin-like protein
<i>rfbD</i>	+ 29,0	+ 85,0	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase subunit, NAD(P)-binding, of dTDP-L-Rhamnose synthase
<i>oppB</i>	+ 70,0	+ 112,0	oligopeptide transporter subunit
<i>oppD</i>	+ 85,0	+ 74,0	oligopeptide transporter subunit
<i>hisF</i>	+ 26,0	+ 56,0	imidazole glycerol phosphate synthase, catalytic subunit with HisH
<i>rfbC</i>	+ 15,0	+ 30,0	dTDP-4-deoxyrhamnose-3,5-epimerase
<i>wbbI</i>	+ 18,0	+ 26,0	B-1,6-galactofuranosyltransferase
<i>gnd</i>	+ 35,0	+ 150,0	gluconate-6-phosphate dehydrogenase, decarboxylating
<i>frdB</i>	+ 15,0	+ 107,0	fumarate reductase (anaerobic), Fe-S subunit

### 5.6.1 SOS-Antwort

Die SOS-Antwort ist ein induzierbares DNA-Reparatursystem, das aus mehr als 50 Genen besteht<sup>(150)</sup>. Es erlaubt Bakterien, plötzliche massiv auftretende Schädigungen der DNA zu überleben<sup>(151)</sup>. Die Gene des Reparatursystems codieren Proteine, welche wichtig für die Replikation, Reparatur, Mutagenese, den Metabolismus und den Schutz der DNA sind<sup>(152)</sup>. Die SOS-Antwort wird durch die beiden Proteine *LexA* und *RecA* reguliert<sup>(152)</sup>. *LexA* ist ein Repressor, der bei auftretenden DNA-Schäden seine autokatalytisch Abspaltung vom Promotor induziert und die SOS-Antwort aktiviert<sup>(151, 152)</sup>. Da *LexA* nur eine schwache autokatalytische Wirkung hat, wird dessen Spaltung zusätzlich durch das *RecA* Filament induziert<sup>(151, 152)</sup>. Die direkte und indirekte CAP-Behandlung führt zu einer starken Überexpression von beiden Genen (s. Tabelle 19). Dies wiederum bestätigt, dass beide Behandlungsregime zu einer Schädigung der DNA führen. Normalerweise kann anhand der exprimierten Gene zwischen Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen in der DNA unterschieden werden. Für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen in der DNA werden neben *RecA* auch von den Genen *RecF*, *RecO* und *RecR* exprimierten

Proteine benötigt<sup>(151)</sup>. Sie unterstützen die Bindung von *RecA* an DNA-Einzelstränge<sup>(151)</sup>. Bei Doppelstrangbrüchen in der DNA werden die Proteine *RecB* und *RecC* zur Induktion der SOS-Antwort benötigt<sup>(151)</sup>. Das Fehlen von *RecF* und *RecO*, die für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen essentiell sind, lässt die Schlussfolgerung zu, dass die direkte und indirekte CAP-Behandlung hauptsächlich zu Doppelstrangbrüchen im bakteriellen Genom führen. Einzelstrangbrüche können jedoch auf Grund der Hochregulierung von *RecA* und *RecR* nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Da darüber hinaus noch weitere Gene, die im Zusammenhang mit dem regulatorischen SOS-Netzwerk stehen, hochreguliert sind, kann davon ausgegangen werden, dass es durch die Behandlung zu einer massiven DNA-Schädigung kommt. Ein Indikator für diese Annahme ist die Überexpression von *umuD*. Dies ist ein Gen, das normalerweise erst in der späten SOS-Antwort exprimiert wird<sup>(150)</sup>. *umuD* kodiert eine Translasi-DNA-Polymerase, die ein gewisses mutagenes Potential mit sich bringt<sup>(150)</sup>. Sie setzt die Toleranz gegenüber DNA-Schäden herauf, wodurch Veränderungen im Genom nicht mehr repariert werden<sup>(150)</sup>. Normalerweise wird *umuD* erst zu einem späteren Zeitpunkt, bei irreparablen DNA-Veränderungen, aktiviert<sup>(151)</sup>. Die Gene der SOS-Antwort werden üblicherweise nicht gleichzeitig aktiviert. In Abbildung 51 ist die Reihenfolge für die Genaktivierung, wie sie z.B. durch starke UV-Strahlung hervorgerufen wird, schematisch dargestellt<sup>(151, 152)</sup>.



**Abbildung 51: Gensequenz mit der die SOS-Antwort durch UV-Strahlung aktiviert wird.**

Die aufgezeichneten Genexpressionsprofile von *E. coli* nach direkter und indirekter CAP-Behandlung zeigen, dass nur ein Teil der in die SOS-Antwort involvierten Gene (*uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *recA* und *umuD*) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verändert exprimiert vorliegen. *sfiA* und *umuC* werden weder durch die direkte noch durch die indirekte CAP-Behandlung in ihrer Aktivität verändert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die SOS-Antwort über eine andere Gensequenz, als die in Abbildung 51 wiedergegebene, aktiviert wird. Das Fehlen der beiden Gene *sfiA* und *umuC* könnte auch ein Hinweis sein, dass die SOS-Antwort nur teilweise und im veränderten Ausmaß aktiviert wird.

### 5.6.2 Oxidativer und nitrosativer Stress

Oxidativer Stress beschreibt bei aeroben Zellen ein Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und ROS, wie z.B. Superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikalen

(OH•)<sup>(153)</sup>. Dies wird entweder durch einen Mangel an Antioxidantien oder ein Überangebot an ROS hervorgerufen<sup>(153, 154)</sup>. Über die selektive Permeabilität der Zellmembran kann der zelluläre Influx von ROS kontrolliert und zum Teil begrenzt werden<sup>(153)</sup>. Ein effektiverer Weg zur Neutralisation von schädigenden ROS-Konzentrationen liegt jedoch in der Hochregulierung von bestimmten Regulons, Gengruppen oder Operons, die die Informationen von Antioxidantien und dazugehörigen Enzymen kodieren<sup>(153, 155)</sup>. In Tabelle 19 sind die Gene aufgelistet, die im Zusammenhang mit oxidativem und nitrosativem Stress stehen und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch eine direkte oder indirekte CAP-Behandlung unterschiedlich exprimiert werden.

Das *oxyR* Regulon und das *soxSR* System spielen bei der bakteriellen Antwort auf oxidativen Stress Schlüsselrollen<sup>(153, 156)</sup>. Während bei *oxyR* keine gegenüber der Kontrolle abweichende Expression nachgewiesen werden konnte, wurde für die Gene *soxR* und *soxS* bei beiden Behandlungsregimen eine starke Überexpression in *E. coli* in dieser Arbeit gezeigt. Das Produkt vom *soxR* Gen (*soxR* Protein) bindet an spezifische Bindungsstellen in der *E.-coli*-DNA und aktiviert die Expression von *soxS*<sup>(153)</sup>. Dies wiederum führt zu einem hohen intrazellulären *soxS*-Proteinlevel<sup>(153)</sup>. Das *soxS* Protein aktiviert spezifische Gene, die im Zusammenhang mit hohen O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>- und NO•-Konzentrationen stehen und als bakterielle Antwort auf diese Moleküle gelten<sup>(153, 157)</sup>. Dies zeigt, dass es schwer ist, oxidativen und nitrosativen Stress klar voneinander abzugrenzen. Daher werden sie in diesem Abschnitt auch zusammen betrachtet.

Die genregulierte Antwort von *E. coli* auf O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> kommt neben der Überexpression von *soxS* auch durch die Hochregulierung von Superoxiddismutasen (SOD) zum Ausdruck<sup>(158)</sup>. *E. coli* verfügt über drei SOD, die als MnSOD (*sodA*), FeSOD (*sodB*) und CuZnSOD (*sodC*) bezeichnet werden. Im vorliegenden Fall wurden durch eine direkte und indirekte CAP-Behandlung jedoch nicht alle SOD aktiviert. Eine Überexpression wurde nur bei *sodA* und *sodB* (s. Tabelle 19) beobachtet. SOD wandeln, entsprechend Gl. 25, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um, welches ebenfalls zu oxidativen Stress führen kann<sup>(158, 159)</sup>.



Auf die Anwesenheit von Peroxiden in schädlichen Konzentrationen reagiert *E. coli* mit einer Induktion von Katalasen. Diese gehören zur Familie der Peroxidasen und bauen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> ab (s. Gleichung 26)<sup>(158, 159)</sup>.



*E. coli* verfügt über zwei Katalasen, Hydroperoxidase I (HPI) und Hydroperoxidase II (HP II), die durch die Gene *katG* und *katE* kodiert werden<sup>(158, 159)</sup>. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der direkten, als auch bei der indirekten CAP-Behandlung die beiden Katalasen durch eine starke Hochregulierung der beiden Gene aktiviert werden. Eine weitere gen-regulierte Antwort von *E. coli* auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist die Aktivierung von *ahpC* und *ahpF*<sup>(160)</sup>. Beide Gene kodieren Alkylhydroperoxidasereduktasen (Peroxiredoxine), die als Scavenger von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fungieren<sup>(160)</sup>. Neben ihrer Funktion als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Scavenger sind sie wahrscheinlich die einzigen Enzyme, welche auch organische Hydroperoxide (ROOH) abbauen können<sup>(160)</sup>. Zudem wurde für *ahpC* gefunden, dass es Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) über eine katalytische Reaktion zu Nitrit umwandeln kann und somit dessen toxische Wirkung neutralisiert<sup>(161)</sup>. Daher kann auch in diesem Fall nicht eindeutig zwischen oxidativen und nitrosativen Stress unterschieden werden.

Weitere wichtige Enzyme, die bei der bakteriellen Antwort auf oxidativen Stress Schlüsselfunktionen übernehmen, sind Thioredoxine. Sie können H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt reduzieren und fungieren als Singulett-Sauerstoff-Quencher und HO<sup>•</sup>-Scavenger<sup>(162)</sup>. Neben diesen Eigenschaften übernehmen Thioredoxine auch wichtige Rollen bei der DNA-Synthese und der Reparatur von Proteinen<sup>(162-164)</sup>. *E. coli* verfügt über zwei Thioredoxine, *trxA* und *trxC*, sowie über eine Thioredoxinreduktase (*trxB*). In ihrer reduzierten Form attackieren *trxA* und *trxC* z.B. nicht regulär eingebaute Disulfidbindungen in Proteinen und werden bei diesem Prozess selber oxidiert. *trxB* wiederum recycelt *trxA* und *trxC* indem es die Disulfide am aktiven Zentrum reduziert<sup>(163, 164)</sup>. Nach einer direkten und indirekten CAP-Behandlung konnte eine Überexpression von *trxA* und *trxB* in *E. coli* nachgewiesen werden, was auf eine nur teilweise Aktivierung des Thioredoxinsystems schließen lässt.

Bei den Versuchen in dieser Arbeit zeigt sich, dass durch beide CAP-Behandlungen auch das Gen *mntH*, welches einen Mangantransporter kodiert, um ein Vielfaches ( $\geq + 38,0$ ) hochreguliert wurde. Dies wiederum lässt auf eine gestörte Eisenhomöostase rückschließen. Es wird angenommen, dass *mntH* durch die Aktivierung von einigen Metalloproteasen das fehlende Eisen substituieren kann<sup>(165)</sup>. Zudem zeigte sich, dass dieses Gen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stark hochreguliert wird und dies ein essentieller Anpassungsmechanismus in *E. coli* ist<sup>(165)</sup>. Ein Fehlen von MntH resultiert in einer Intoleranz von *E. coli* gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>(165)</sup>.

### 5.6.3 Transporter

Durch die Morphologie der Zellwand sind Prokaryonten gegen das ungehinderte Einströmen von unerwünschten und toxischen Substanzen relativ gut geschützt. Aufgrund der geringen Permeabilität der äußeren Membran ist die Diffusion von extrazellulären Bestandteilen in die Zelle

begrenzt<sup>(166)</sup>. Dieser Schutz kann bei Bedarf durch den Verlust von Porinen<sup>1</sup> noch verbessert werden<sup>(166)</sup>. Beide Mechanismen können das Eindringen von schädlichen und toxischen Stoffen nicht vollständig verhindern. Daher hat die Zelle im Laufe der Evolution Transportmoleküle, sog. Multidrug Resistance Effluxpumpen (MDR-Pumps), entwickelt, die den aktiven Auswärtstransport dieser Moleküle übernehmen.

Bei den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit zeigt sich, dass nach der direkten und indirekten CAP-Behandlung die Gene einiger Transportmoleküle hoch- bzw. runterreguliert wurden. Darunter befanden sich auch MDR-Pumpen, die durch die beiden CAP-Behandlungen gegenläufig exprimiert wurden. So führte die indirekte CAP-Behandlung zur Herunterregulierung von *mdtL* (-2,2), *mdtJ* (-3,3), *mdtE* (-4,1), *mdtD* (-3,7) und *mdtF* (-2,8) und die direkte Behandlung aktivierte die angeführten Gene wie folgt: *mdtL* (+5,2), *mdtJ* (+4,1), *mdtE* (+3,0), *mdtD* (+2,0) und *mdtF* (+2,0). Diese nachweislichen Unterschiede in den beiden Genexpressionsprofilen von *E. coli* nach indirekter und direkter CAP-Behandlung sind ausgesprochen bemerkenswert und deuten darauf hin, dass die Wirkmechanismen der beiden Behandlungsregime, trotz ähnlich postulierter chemischer Reaktionen in der Plasmagasphase und in der flüssigen Phase, nicht identisch sind. Eine mögliche Erklärung kann die zusätzliche UV-Strahlung, welche bei der direkten CAP-Behandlung auf die in NaCl-Lösung suspendierten Mikroorganismen einwirkt, sein. Wie bereits am Beispiel von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dargestellt kann UV-Strahlung die Photolyse chemischer Substanzen in der flüssigen Phase induzieren, welche zur Bildung von sehr kurzlebigen und derzeit nicht eindeutig identifizierten Produkten führen kann. Im Fall der direkten CAP-Behandlung haben diese, hier postulierten, kurzlebigen Photolyseprodukte die Chance mit den suspendierten Mikroorganismen zu interagieren und so ihre toxische Wirkung zu entfalten. Im Fall der indirekten CAP-Behandlung kann die Zeit zwischen CAP-Behandlung und beimpfen der plasmaaktivierten NaCl-Lösung mit *E. coli* als limitierender Faktor für die Wirkung dieser kurzlebigen Photolyseprodukte in Betracht gezogen werden. Dies erklärt wiederum die unterschiedlichen Expressionsprofile von direkt und indirekt behandelten *E. coli*-Organismen.

Da MDR-Pumpen eine wichtige Funktion bei der Ausbildung von Resistenzen übernehmen, könnten die unterschiedlich exprimierten Gene ein Hinweis darauf sein, dass sich die Bakterienzellen auf unterschiedliche Weise gegen die direkte bzw. indirekte CAP-Behandlung zur

---

<sup>1</sup> Porine sind porenformende Transportmoleküle in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien.

Wehr setzten und eventuell schnell gegen die entsprechende CAP-Behandlung Resistenzen ausbilden.

#### 5.6.4 Nitratreduktion und Nitratatmung

Stickstoff ist ein essentielles Molekül für alle prokaryotischen und eukaryotischen Zellen. Er dient als Ausgangsstoff für die Synthese von Proteinen und Nukleinsäuren, welche als die wichtigsten Gruppen der biologischen Makromoleküle eingestuft werden<sup>(167)</sup>. Jedoch ist molekularer Stickstoff für die Zelle wenig nützlich und muss in Form von z. B. Nitraten aufgenommen werden. Bei der metabolischen Gewinnung von elementarem Stickstoff aus Nitraten spielt das Multifunktionssystem der Nitratreduktion eine entscheidende Rolle<sup>(167)</sup>. Die Nitratreduktion kann zu drei unterschiedlichen Zwecken in der Zelle erfolgen<sup>(167)</sup>:

1. die Nutzung als Stickstoffquelle für das Zellwachstum (Nitratassimilation)
2. die metabolische Energiegewinnung unter Verwendung von  $\text{NO}_3^-$  als terminalem Elektronenakzeptor (Nitratatmung)
3. die Verringerung von im Überschuss bestehenden reduzierenden Kräften, zur Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Gleichgewichtes (Nitratdissimilation).

Durch direkte und indirekte CAP-Exposition werden die Gene *narQ*, *narG*, *narV*, *narU*, *narW*, *narY*, *narI*, *narZ*, *narJ*, *narL* und *narH* in *E. coli* zum größten Teil herunterreguliert. Diese Gene codieren in sog. Clustern respiratorische membrangebundene Nitratreduktasen (NAR) und Nitratreduktase-assoziierte Proteine, welche im Zusammenhang mit der Nitratatmung stehen. Die Energiegewinnung über die Nitratatmung erfolgt vor allem in einer anaeroben Atmosphäre. Unter aeroben Umgebungsbedingungen kann sie aber auch partiell parallel zur normalen Zellatmung erfolgen, wobei in diesem Fall die Zellatmung der Hauptenergielieferant ist<sup>(146)</sup>. Für *E. coli* sind nur zwei NAR, nämlich Nitratreduktase A und Z (NRA und NRZ) bekannt<sup>(168)</sup>, welche durch die Gencluster *narGHJI* und *narZYWV* codiert werden. Im vorliegenden Fall lassen die herunterregulierten Gene *narG*, *narV*, *narW*, *narY*, *narI*, *narZ*, *narJ* und *narH* die Schlussfolgerung zu, dass NRA und NRZ inaktiv sind und die normale Zellatmung als Energiequelle der Zelle dient. Dies wird zusätzlich durch die Tatsache untermauert, dass das aktive Zentrum von *NarG*, einem essentiellen Elektronenakzeptor, auf der cytoplasmatischen Seite der Membran liegt und dies für eine effektive Nitratatmung einen aktiven Transport von  $\text{NO}_3^-$  in die Zelle erforderlich macht<sup>(167)</sup>. Das Nitrattransportsystem ist ausgesprochen spezifisch für  $\text{NO}_3^-$  und wird durch die Anwesenheit von Sauerstoff effektiv in seiner Funktion inhibiert<sup>(167)</sup>.

Ein aktiver Transport von  $\text{NO}_3^-$  in die Zelle unter den angegebenen Versuchsbedingungen kann damit ausgeschlossen werden.

Neben den NAR ist auch die dissimilatorische periplasmatische Nitratreduktase, die sog. NAP, bekannt<sup>(167)</sup>, welche für die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes verantwortlich ist<sup>(167)</sup>. Das ausbalancierte Redox-Gleichgewicht ist wiederum für ein optimales bakterielles Wachstum unerlässlich. Eine indirekte CAP-Behandlung führte dazu, dass die Gene *napA*, *napF* und *napD* in *E. coli* überexprimiert werden. Dies gibt den Anlass zur Annahme, dass das Redox-Gleichgewicht durch diese Art der CAP-Exposition gestört wird und die Zelle sich aktiv gegen die reduzierenden Faktoren zur Wehr setzt. Demgegenüber bewirkte eine direkte CAP-Exposition, neben einer Überexpression von *napA* und *napF*, eine deutliche Runterregulierung von *napD*, einem für die Aktivierung von NAP essentiellen Gen. Damit ist eine erhöhte Aktivität von NAP nach direkter CAP-Exposition ausgeschlossen. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass bei der indirekten CAP-Behandlung oxidierende Agenzien einen stärker schädigenden Einfluss auf *E. coli* haben könnten als bei der direkten Behandlung. Dies wiederum würde ebenfalls belegen, dass sich die Wirkmechanismen der beiden Behandlungsregime sehr ähnlich, aber nicht gleich sind.

An dieser Stelle soll zusätzlich darauf hingewiesen werden, dass die physiologische Rolle von NAP bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen auch variieren kann<sup>(167)</sup>. Wie bereits oben beschrieben, ist NAP ein dissimilatorisches Enzym, welches für die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes verantwortlich ist. Neben dieser Funktion ist NAP auch bekannt dafür, dass es in dem Prozess der aeroben Denitrifikation involviert ist und unter schwierigen Umgebungsbedingungen das bakterielle Wachstum so begünstigen kann<sup>(167)</sup>. Hierbei wird im Periplasma Nitrat zu Nitrit reduziert<sup>(167)</sup>. Dieser Umstand zeigt, dass die unter 3.5 beschriebene Hypothese zur Bildung von sauren Nitriten im periplasmatischen Spalt, durch die Reduktion von Nitrat zu Nitrit sowie die Absenkung des periplasmatischen pH-Wertes theoretisch möglich ist.

### 5.6.5 Andere mit Stress in Verbindung stehende Gene

Die Komplexität mit der CAP auf *E. coli* einwirkt wird noch einmal verdeutlicht, wenn man sich die Proteine und deren Funktion anschaut, die durch die mit Stress in Verbindung stehenden Genen kodiert werden. So zeigt z.B. die Hochregulierung von *smpA*, dass die direkte wie auch indirekte CAP-Behandlung einen störenden Einfluss auf die Permeabilität der Membran und dessen Integrität ausübt. *smpA* ist ein Synonym für *bmpA* und kodiert das Protein BmpA, welches ein essentieller Teil des sog. Bam-Komplexes ist<sup>(169)</sup>. Der Bam-Komplex besteht aus

einer Reihe von *outer membran beta-Barrel* Proteinen, die für die Biosynthese der äußeren Bakterienmembran verantwortlich sind<sup>(169)</sup>. Die Hochregulierung von *smpA* ist daher ein deutlicher Hinweis, dass die Biosynthese in *E. coli* durch den membranschädigenden Einfluss der CAP-Behandlungen induziert wird.

*smpB*, ein weiteres durch CAP-Exposition überexprimiertes Gen kodiert das *small protein B* (SmpB), welches an blockierte mRNA-Moleküle bindet und die Synthese dieser Proteine reaktiviert<sup>(170)</sup>. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass CAP-Behandlung auch einen negativen Einfluss auf die Proteinbiosynthese hat. Durch die Hochregulierung von *smpA* versucht sich *E. coli* vermutlich gegen diesen schädigenden Effekt zu schützen.

### 5.6.6 Regulatorische und stoffwechselassoziierte Gene

Anders als bei Sharma *et al.*<sup>(148)</sup> und Joshi *et al.*<sup>(149)</sup> führt eine direkte und indirekte CAP-Behandlung von *E. coli* zu einer starken Aktivierung von unterschiedlichen Stoffwechsel-assoziierten Genen (s. Tabelle 19). Dies weist darauf hin, dass die unter stressinduzierten, schädlichen Umgebungsbedingungen untersuchten *E. coli*-Zellen in ungerichtete energiekonsumierende Prozesse investieren, welche vermutlich zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase dienen und somit zusätzlich zum Überleben der Zelle beitragen sollen. Da die in Tabelle 19 aufgelisteten Gene, welche in regulatorische oder stoffwechselassoziierten Prozessen involviert sind, in dieser Arbeit zu keinem klaren Bild und somit nicht zur weiteren Klärung von plasmainduzierten Wirkmechanismen beitragen können, wird an dieser Stelle auf eine Diskussion dieser Gene und deren Funktion verzichtet. Dies soll jedoch nicht bedeuten, dass in diesem Bereich nicht weiter nachgeforscht werden sollte. Hier besteht durchaus ein großes Potential, die plasmainduzierten antimikrobiellen Wirkmechanismen aufzuklären.

Die bei Sharma *et al.*<sup>(148)</sup>, Joshi *et al.*<sup>(149)</sup> und in der vorliegenden Arbeit gefundenen unterschiedlichen Genexpressionsprofile von *E. coli* zeigen deutlich, dass sowohl unterschiedliche Plasmaanlagen als auch unterschiedliche Behandlungsregime (direkt und indirekt) zum Teil sehr unterschiedliche zelluläre Antworten in *E. coli* hervorrufen können und die Zellen in ihrem Stoffwechsel entweder aktiviert oder deaktiviert werden.

### 5.6.7 Schlussfolgerungen zum Genexpressionsprofil von *E. coli* nach CAP-Behandlung

Mit Hilfe der Microarraybasierten Genexpressionsanalyse sollten auf zellulärer Ebene die Mechanismen des CAP-induzierten Zelltods von *E. coli* identifiziert werden. Es wurde demonstriert, dass *E. coli* viele wichtige Gene nach direkter und indirekter CAP-Behandlung



hochreguliert, welche in der adaptiven Antwort auf oxidativen und nitrosativen Stress von Bakterien involviert sind. Es wurden überexprimierte Gene identifiziert, die auf Superoxid, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und reaktive Stickstoffverbindungen, wie z.B.  $\text{ONOO}^-$ , reagieren und entsprechende Zellantworten induzieren. Dies zeigt deutlich, dass ROS und RNS einen maßgeblichen Anteil an den antimikrobiellen Effekten von Plasma haben und vermutlich ihre schädigenden Effekte kollektiv auf den verwendeten Testorganismus *E. coli* ausüben. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass die plasmagenerierten ROS und RNS massive DNA-Schäden hervorrufen, wie aus der nachweislichen Aktivierung der SOS-Antwort durch die direkte und indirekte CAP-Behandlung geschlussfolgert werden kann. Es entstehen mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl Einzelstrang- als auch Doppelstrangbrüche in der Bakterien-DNA, wobei Anhand der vorliegenden Datenlage eine Präferenz für Doppelstrangbrüche beobachtet werden konnte. Diese anscheinende Präferenz sollte zukünftig weiter untersucht und ggf. belegt werden.

Neben den DNA-schädigenden Effekten wurde demonstriert, dass CAP einen störenden Einfluss auf die Permeabilität der Membran und somit auf ihre Integrität ausübt. Die Aktivierung des Bam-Komplexes ist ein deutlicher Hinweis darauf. Wie bereits oben beschrieben wird die Permeabilität der Membran durch die Wechselwirkung von ROS und RNS mit Membranbestandteilen beeinflusst. Daher sollte in weiterführenden Projekten untersucht werden inwiefern plasmaerzeugte ROS und RNS mit Membranbestandteilen interagieren und deren Funktionen beeinträchtigen.

Ein weiterer wichtiger Hinweis für die Wirkungsweise von CAP offenbarte sich durch die Aktivierung von SmpB. Es wurde hierdurch gezeigt, dass die Proteinbiosynthese durch die CAP-Behandlung beeinträchtigt sein kann. Zudem wurde in der vorliegenden Studie eine zusätzliche Aktivierung des zellulären Stoffwechsels beobachtet. Die Aktivierung des Stoffwechsels ist eine unerwartete Reaktion, da sich die Zelle zum Zeitpunkt der CAP-Exposition in der stationären Phase befindet und in ein nährstoffarmes Medium (NaCl-Lösung) überführt wird. Ohne Nährstoffe ist dies von der Zelle nur schwer und begrenzt umsetzbar. Die dargestellten zellulären Prozesse zeigen, dass die untersuchten Bakterien Höchstleistungen erbringen, um sich gegen die vielen unterschiedlichen letalen Einflüsse zu wehren. Es zeigt aber auch, dass die Zellantwort nicht immer gegen eine bestimmte Wirkung gerichtet ist. Basierend auf den hier gefundenen Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass der Zelltod von *E. coli* auf ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen zurückgeführt werden kann. Hierbei seien plasmainduzierte DNA-Schäden an erster Stelle genannt, gefolgt von Schädigungen der Membran und die hier gefundene negative Beeinflussung der Proteinbiosynthese. Zudem deutet die teilweise

ungerichtete Zellantwort auf noch völlig unbekannte Mechanismen hin und sollte unbedingt weiterführend untersucht werden. Auch wenn heute noch nicht alle Wirkmechanismen eindeutig geklärt sind, kann trotzdem aufgrund der Komplexität mit der CAP auf Bakterienzellen einwirkt, davon ausgegangen werden, dass die Ausbildung von Resistenzen gegen diese Form der Behandlung weiterhin unwahrscheinlich ist. Eine Validierung der hier gefundenen Ergebnisse sollte in jedem Fall in einer weiterführenden Studie mittels Microarraybasierter Genexpressionsanalyse und Realtime PCR (Polymerase-Kettenreaktion) vorgenommen werden.

### **5.7 Anwendung CAP-behandelter antimikrobiell wirksamer Lösungen**

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass mittels CAP antimikrobiell aktive NaCl-Lösungen mit Kurz- und Langzeitwirkung hergestellt werden können. Die Untersuchungen gaben ebenfalls Aufschluss über mögliche antimikrobielle Agenzien sowie deren potentiellen Wirkmechanismen. In diesem Abschnitt sollen nun denkbare Anwendungsgebiete dargestellt und in diesem Zusammenhang die Anwendbarkeit dieser Lösungen untersucht werden. So wäre es z.B. denkbar, dass CAP-behandelte antimikrobiell wirksame Lösungen z.B. eine Alternative zur klassischen Wundspülung mit Wasser oder physiologische Kochsalzlösung werden könnten<sup>(55, 56, 58)</sup>. Neben der bloßen Reinigung könnten CAP-behandelte Lösungen gleichzeitig durch ihren antimikrobiellen Effekt das Infektionsrisiko weiter minimieren und die Wunde so für die nachfolgende Behandlung mit wundheilungsfördernden oder antibiotisch wirksamen Salben optimal vorbereiten. Ein weiteres Anwendungsgebiet für diese Lösungen könnte auch in der Transplantationsmedizin zu finden sein. Hier im Besonderen bei der Dekontamination von entnommenen Augen, die im Rahmen einer Hornhauttransplantation entsprechend aufbereitet werden müssen. Da die Anwendung von Antibiotika aufgrund ihrer zellschädigenden Effekte in diesem Prozess mittlerweile verboten ist, müssen zur Minimierung des Infektionsrisikos effektive Alternativen, wie z.B. CAP-behandelte Lösungen, gefunden werden. Ein Vorteil dieser Lösungen besteht darin, dass sie bei Bedarf mit wenig Aufwand frisch hergestellt werden können und eine Wirksamkeit über einen unmittelbar folgenden Anwendungszeitraum (innerhalb von 30 min) gewährleisten (s. auch Abbildung 48). Da die Wirkung dieser Lösungen bisher überwiegend nur an *E. coli* getestet wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals das Wirkspektrum von CAP-behandelten NaCl-Lösungen bestimmt, um das Anwendungspotential dieser Lösungen noch besser abschätzen zu können. Hierfür wurden die in der DIN SPEC 91315<sup>(59)</sup> vorgegebenen Prüforganismen verwendet. Die antimikrobielle Wirkung wurde an *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* und *C. albicans* getestet. Dies sind Vertreter grampositiver und gramnegativer Bakterien sowie einer Hefe. Abbildung 52 zeigt die

Vitalität der Prüforganismen in 5 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit  $t_3$  mit einer Wartezeit zwischen Plasmabehandlung und Beimpfung von  $t_2 = 0$  min. Dargestellte Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen dargestellt. Mit Ausnahme von

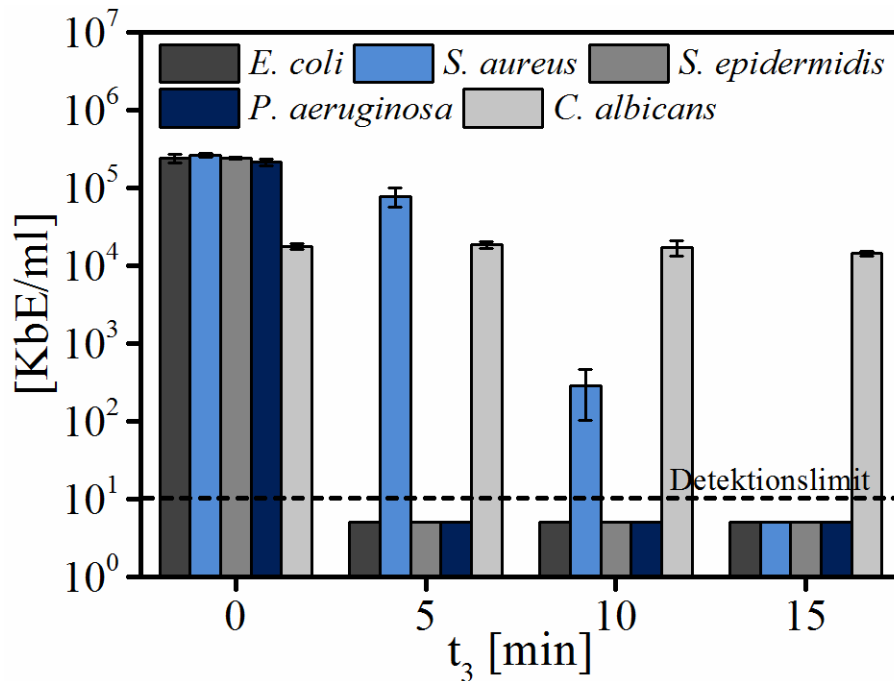


Abbildung 52: Vitalität von *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* und *C. albicans* in 5 min CAP-behandelter NaCl-Lösung. Die Anzahl der KbE/ml ist in Abhängigkeit von der Einwirkzeit  $t_3$  (min) der plasmabehandelten NaCl-Lösung auf die Mikroorganismen dargestellt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ).

*S. aureus* und *C. albicans* reduzieren 5 min CAP-behandelte NaCl-Lösungen die Anzahl der KbE der übrigen Prüforganismen bereits nach 5 min Einwirkzeit bis unter die Nachweisgrenze. Um die gleiche Reduktion bei *S. aureus* zu erzielen wird eine Einwirkzeit ( $t_3$ ) von 15 min benötigt. *C. albicans* kann auch nach 15 min Einwirkzeit ( $t_3$ ) nicht in seinem Wachstum beeinträchtigt werden.

*C. albicans* ist ein Hefepilz der Gruppe *Candida*. Er verfügt über eine relativ stark ausgeprägte Resistenz gegenüber oxidativem Stress<sup>(171, 172)</sup>. Neben den Transkriptionsfaktoren *Cap1*, *Skp7* und *Cat4* sind Signalproteine, wie z.B. *Hog1*, *Ssk1*, *Sho1* und *Pde2*, für die reduzierte Sensitivität von *C. albicans* gegenüber ROS und RNS verantwortlich<sup>(172)</sup>. In den vorangegangenen Abschnitten 5.3 und 5.4 wurde bereits über die Bildung von RNS und ROS durch CAP berichtet und die besondere Bedeutung dieser Spezies bei der antimikrobiellen Wirkung hervorgehoben. Die in diesem Zusammenhang nachweislich fehlende wachstumshemmende Wirkung von CAP-behandelten NaCl-Lösungen auf *C. albicans* untermauert die Aussage, dass dieser

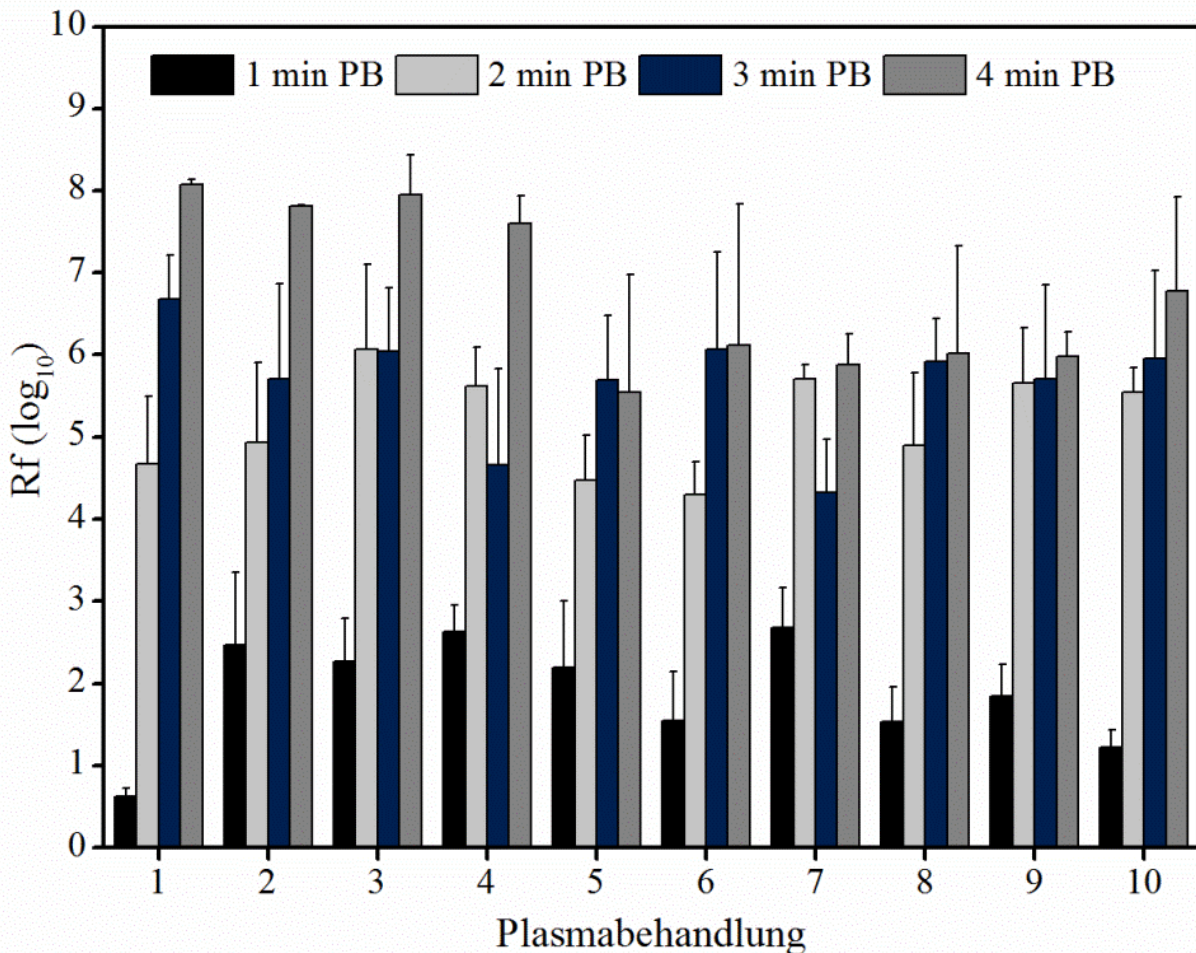
Organismus über relativ stark ausgeprägte Resistenzen gegenüber oxidativem Stress verfügt. Bei den hier untersuchten Bakterienstämmen wurde nur für das grampositive Bakterium *S. aureus* eine abgeschwächte Sensitivität gegenüber CAP-behandelten NaCl-Lösungen nachgewiesen. Es ist sehr widerstandsfähig gegenüber nitrosativen Stress<sup>(173)</sup>. Dies liegt zum Teil daran, dass *S. aureus* NO• effektiv neutralisiert und die toxische Wirkung aufhebt. Hierbei übernehmen das Flavohemprotein (Hmp) und L-Lactatdehydrogenase (*ldhI*) Schlüsselfunktionen<sup>(174, 175)</sup>. Hmp oxidiert NO• zum harmlosen Nitrat<sup>(174)</sup>. Das gramnegative Bakterium *E. coli* verfügt über ein gleichwertiges Hmp, jedoch kann es sich, im Gegensatz zu *S. aureus*, bei hohen NO• Konzentrationen nicht replizieren<sup>(173)</sup>. Letzteres gilt auch für *S. epidermidis*<sup>(175)</sup>. Neben der unterschiedlichen Zellwandmorphologie von grampositiven und gramnegativen Bakterien wird dies die abweichende Sensitivität der Organismen gegenüber CAP-behandelter NaCl-Lösung hauptsächlich begründen. Ein weiteres Indiz ist, dass die antimikrobiellen Effekte vorwiegend durch RNS hervorgerufen werden. Zudem hat sich gezeigt, dass zur Abdeckung des grampositiven und gramnegativen Bakterienspektrums eine Einwirkzeit von 15 min nicht unterschritten werden sollte.

Wie bereits oben erwähnt, sind die genauen Wirkmechanismen der flüssigkeitsvermittelten Plasmaeffekte bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich ist es ein Zusammenspiel zwischen den unter 3.2 angeführten Agenzien sowie evtl. zellulär ablaufenden Prozessen. Dies kann für die Anwendung von CAP-aktivierten NaCl-Lösungen ein großer Vorteil sein. Die Ausbildung von Resistenzen ist bei einem komplexen Synergismus von mehreren Reaktionspartnern und Wirkmechanismen eher unwahrscheinlich. Jedoch sind Bakterien wahre Überlebenskünstler und können sich sehr schnell durch spontane Mutation oder Konjugation<sup>2</sup> an toxische Umgebungsbedingungen anpassen<sup>(49, 52, 66)</sup>. Auf Grund dieser außergewöhnlichen Anpassungsfähigkeit wurde mit einer weiteren Testreihe die Langzeitempfindlichkeit von *E. coli* gegenüber CAP-behandelten NaCl-Lösung geprüft. Zu diesem Zweck wurde ein Behandlungsregime entwickelt, das wiederholende Expositionen von CAP-behandelten NaCl-Lösungen auf rekultivierte Bakterien ermöglichte. In Abbildung 53 sind die Reduktionsfaktoren (Rf) von *E. coli* gezeigt, die nach 1-10-maliger Behandlung mit jeweils 1-4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen ermittelt wurden. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichung wiedergegeben. Erwartungsgemäß ist die Effektivität der Inaktivierung von der Plasmabehandlungsdauer abhängig. Mit einer Behandlungszeit von einer Minute

---

<sup>2</sup> Konjugation ist der Transfer antibiotischer Resistenzgene von einem Bakterium auf ein anderes.

werden die kleinsten Rf-Werte erzielt. Der höchste Rf-Wert wird bei fast jedem der 10 Behandlungszyklen mit einer Plasmabehandlung von 4 min erhalten. Die einzige Ausnahme zeigt sich beim fünften Behandlungszyklus, wobei der erzielte Rf-Wert von 4 min CAP-behandelte NaCl-Lösungen unterhalb des Rf-Wertes von 3 min CAP-behandelte NaCl-



**Abbildung 53:** Untersuchungen zur Ermittlung einer möglichen erworbenen Resistenz von *E. coli* gegenüber wiederholt applizierten CAP-behandelten NaCl-Lösungen auf rekultivierte Bakterienkolonien. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der Log<sub>10</sub>-Reduktionsfaktoren (Rf) von 1-4 min plasmabehandelten NaCl-Lösungen. Die Einwirkzeit bei den ersten 1-8 Plasmabehandlungen (PB) betrug 5 min, bei der 9. PB betrug sie 15 min und bei der 10. PB 20 min<sup>(49)</sup>. Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (n ≥ 9).

Lösungen liegt und dabei einem starken Schwankungsbereich unterliegt. Darüber hinaus zeigt sich ebenfalls ab dem fünften Behandlungszyklus, dass die Rf-Werte für 4 min CAP-behandelte NaCl-Lösungen deutlich von ca. 8 auf 6 log<sub>10</sub>-Stufen abfallen. Für die anderen Behandlungszeiten (1-3 min) kann dieser Trend nicht beobachtet werden. Es zeigt sich sogar, dass 2 und 3 min CAP-behandelte NaCl-Lösungen über alle 10 Behandlungszyklen Rf-Werte zwischen 4, 5 und 6 log<sub>10</sub>-Stufen erzielen. Ab der fünften bis zur achten Plasmabehandlung blieb der mit 4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen erhaltene Rf-Wert annähernd konstant bei 6 log<sub>10</sub>. Hohe

Rf-Werte wie bei den ersten vier Plasmabehandlungen konnten mit den 4 min CAP-behandelten Lösungen ab der fünften Plasmabehandlung nicht mehr erzielt werden. Daher wurde durch eine systematische Steigerung der Einwirkzeit ( $t_3$ ) versucht die Effektivität der Inaktivierung positiv zu beeinflussen. Die Einwirkzeit wurde bei der neunten Plasmabehandlung von 5 min auf 15 min verlängert. Wie in Abbildung 53 zu sehen ist, führte dies zu keiner nachweislichen Steigerung des Rf-Wertes. Daher wurde im anschließenden 10. Behandlungszyklus  $t_3$  für 4 min CAP-behandelte NaCl-Lösungen weiter auf 20 min erhöht. Dies wiederum führte zu einer nachweislichen Steigerung des Rf-Wertes dieser Lösungen. Jedoch konnte auch mit einer Verlängerung von  $t_3$  auf 20 min kein stabiler Rf von 8  $\log_{10}$  erzielt werden. Die Streuungen um den Mittelwert zeigen jedoch, dass dies in einzelnen Experimenten doch erreicht wurde. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass zumindest ein Teil der *E.-coli*-Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber CAP-behandelten NaCl-Lösungen entwickeln, was nicht ungewöhnlich ist, da *E. coli* ein sehr anpassungsfähiger Organismus ist, der sich eine Vielzahl von Adaptionsmechanismen angeeignet hat. Diese ermöglichen es ihm, sich gegen toxische Umwelteinflüsse effektiv zu schützen. Ein niedriger pH-Wert oder eine in antibiotisch wirksamen Konzentrationen vorliegende Substanz wie  $H_2O_2$  sind Beispiele für solche lebensbedrohlichen Umgebungsbedingungen. Wie oben bereits erwähnt verfügt *E. coli* über zelluläre Resistenzmechanismen, die es ihm erlauben, bei pH-Werten zwischen 4, 5 und 9 unbeeinträchtigt zu wachsen. Es ist sowohl im sauren als auch im basischen Milieu in der Lage, seinen eigenen zytosolischen pH-Wert in einem Bereich von 7,2 bis 7,8 zu halten<sup>(49, 111)</sup>. Die metabolischen Prozesse im Zytosol bleiben somit unbeeinträchtigt vom extrazellulären pH. Zudem wurden im Periplasma von *E. coli* die Chaperone<sup>3</sup> HdeA und HdeB gefunden, welche die Proteinfaltung unter säureinduzierten Stress unterstützen und fehlerhafte Faltungen unterbinden<sup>(49, 111)</sup>. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte könnte man die möglicherweise partiell erworbene Resistenz von rekulti-vierten *E. coli* gegenüber CAP-behandelten NaCl-Lösungen mit einer möglichen Überexpression von HdeA und HdeB sowie der effektiven Aufrechterhaltung des zytosolischen pH-Wertes erklären. Auch ein Synergismus zwischen den beiden Mechanismen könnte möglich sein, wodurch die Sensibilität von *E. coli* weiterhin abnehmen würde. Jedoch konnten in der Genexpressionsanalyse keine Hinweise für eine veränderte Expression von HdeA und HdeB nachgewiesen werden, was die Anwesenheit dieser Chaperone jedoch nicht ausschließt. Mit Hilfe der

---

<sup>3</sup> Chaparone sind Proteine, die bei der korrekten Faltung von frisch synthetisierten Proteinen assistieren und diese vor schädlichen Umwelteinflüssen schützen<sup>(25)</sup>.

Genexpressionsanalyse konnten auch veränderte Expressionen von Genen nachgewiesen werden, die MDR-Pumpen kodieren. Wie in Tabelle 19 angegeben, bewirkt eine indirekte CAP-Behandlung die Hochregulierung der folgenden Gene: *fhuC*, *fhuA*, *fhuF*, *lsrA*, *lsrC*, *glnH*, *proY* und *proP*. Die Überexpression dieser MDR-Pumpen könnten eine weitere Erklärung für die möglicherweise teilweise erworbene Resistenz sein. Wären diese Schlussfolgerungen korrekt, müsste im Umkehrschluss für alle CAP-behandelten NaCl-Lösungen (1-4 min) eine Abnahme der Rf-Werte beobachtet werden. Dies entspricht jedoch nicht den Tatsachen. Die Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber 2 und 3 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen blieb bei allen 10 Plasmabehandlungen konstant. Trotz des sauren pH-Wertes konnte keine Abnahme der Rf-Werte beobachtet werden. Daher sind die angeführten Resistenzmechanismen gegenüber pH-Fluktuationen nur eine schwache Begründung für die reduzierte antimikrobielle Wirkung von 4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evtl. einen Einfluss auf die abnehmende Empfindlichkeit von *E. coli* auf 4 min CAP-behandelte NaCl-Lösungen hat. In mehreren Abschnitten dieser Arbeit wurde schon darauf eingegangen, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für Bakterien toxisch ist und dass die hier nachgewiesenen Konzentrationen unterhalb der MHK liegen. Trotzdem darf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufgrund des potentiellen Synergismus zwischen den zahlreichen reaktiven Spezies als mögliches antimikrobielles Agens nicht außer Betracht gelassen werden. Da *E. coli* ein sehr anpassungsfähiger Organismus ist, soll an dieser Stelle auch auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Resistenzmechanismen eingegangen und eine Schlussfolgerung gezogen werden. *E. coli* verfügt über ein hoch spezifisches zelluläres System, das die toxischen Effekte von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neutralisiert<sup>(49)</sup>. Hierbei stellen die Enzyme Katalase und Peroxidase Schlüsselmoleküle dar<sup>(49)</sup>. Sie zersetzen das toxische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effektiv zu harmlosen Verbindungen wie z.B. O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. Die Aktivierung der beiden Enzyme erfolgt bereits bei einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 20 µmol (0,68 mg/l)<sup>(49, 176, 177)</sup>. Ähnlich geringe Konzentrationen (~ 30 µmol = 1,02 mg/l) werden auch in CAP-behandelten NaCl-Lösungen gemessen. Demzufolge müssten die beiden Enzyme auch in den rekultivierten *E.-coli*-Kolonien bereits eine erhöhte Aktivität aufweisen. Eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Intoxikation durch CAP-behandelte NaCl-Lösung scheint sehr unwahrscheinlich und somit ist eine zelluläre Katalase/Peroxidase-Antwort von *E. coli* keine passende Erklärung für die abnehmende Sensibilität gegenüber CAP-behandelter NaCl-Lösung.

Die Abnahme des anfänglich sehr hohen Rf von 4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen könnte auch einfach damit begründet werden, dass die Empfindlichkeit des verwendeten Quantitativen Suspensionsversuches zu gering ist und der Nachweis einen zu großen Schwankungsbereich im oberen Detektionsbereich aufweist. Diese Schlussfolgerung wird durch die hohe Varianz um den Mittelwert von 4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen gestützt. Faktoren,

wie die Ausgangskonzentration und die Wachstumsphase der Mikroorganismen, haben neben der Stabilität der verwendeten Plasmaanlage einen entscheidenden Einfluss auf die Testergebnisse. Die durchgeführten Untersuchungen decken auch nur einen kurzen Zeitraum ab und lassen somit lediglich eine erste grobe Einschätzung über die Wahrscheinlichkeit einer auftretenden bakteriellen Resistenz zu. Weiterführende Studien sind unbedingt von Nöten, um diese sehr wichtige Frage bzgl. der bakteriellen Immunität zu klären. Vergleichende Untersuchungen mit direkt appliziertem CAP auf in NaCl-Lösung suspendierte *E. coli* wurden nicht durchgeführt, da aufgrund der kontinuierlichen Bildung und des Transfers von  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}$  und  $\text{O}_3$  in die Suspensionen eine Resistenz als unwahrscheinlich erscheint<sup>(49)</sup>. Zudem haben Zimmerman *et al.*<sup>(178)</sup> bereits gezeigt, dass Bakterien keine Resistenzen gegen direkt angewendetes CAP ausbilden.

Einleitend zu diesem Kapitel wurde bereits über die Möglichkeit der Anwendung von CAP-behandelten NaCl-Lösungen zur Reinigung und Spülung von Wunden geschrieben. Die moderne Medizin verwendet hierfür klassischerweise immer noch reines Wasser oder physiologische Kochsalzlösung<sup>(55, 56, 58)</sup>. Nach dieser Reinigung werden bei kritisch infizierten Wunden häufig Antibiotika systemisch gegeben oder Antibiotika-haltige Salben aufgetragen<sup>(179-181)</sup>. Die Kombination von zwei Verfahren ist eine gängige Methode in der Medizin, um den Therapieerfolg zu steigern. Mit Hinblick auf eine mögliche Anwendung von CAP-behandelten NaCl-Lösungen im Bereich der Wundspülung und der potentiellen Kombination mit Antibiotika soll an dieser Stelle in einem ersten Untersuchungsmodell das Zusammenspiel dieser beiden Verfahren untersucht werden. Im Falle einer Kombinationstherapie kann es (immer) dazu kommen, dass die eine Therapie die andere negativ beeinflusst. Deshalb wurde im nachfolgenden Versuch getestet, ob eine Vorbehandlung mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen zu einer veränderten Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber handelsüblichen Antibiotika führt. Zu diesem Zweck wurden Antibiotogramme für Amikacin, Ampicillin, Cefazolin, Gentamicin, Tetracyclin, Ticarcillin, Tobramycin und Trimethoprim aufgezeichnet, wobei immer wieder exponierte und rekultivierte Bakterienkulturen in neun aufeinanderfolgenden Behandlungszyklen mittels Agardiffusionstest/Hemmhoftest untersucht wurden. Für die Testungen der direkten und indirekten Plasmabehandlung wurde eine Behandlungszeit ausgewählt, welche eine 50 %ige Inaktivierung von *E. coli* hervorruft, da für das nachfolgende Antibiotogramm überlebende Zellen benötigt wurden. Die Abbildung 54 und 55 zeigen die Durchmesser der Hemmhöfe nach einer Vorbehandlung mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus mindestens sechs voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Streuungen um den



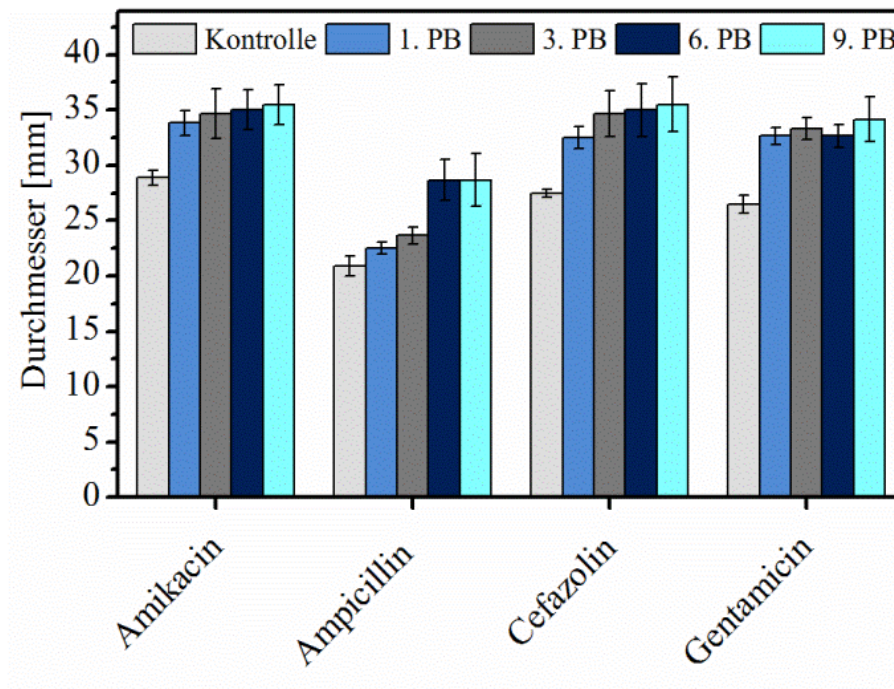


Abbildung 54: Durchmesser der Hemmhöfe [mm] von Amikacin, Ampicillin, Cefazolin und Gentamicin nach vorheriger Behandlung von *E. coli* mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen ( $t_1 = 1,5$  min;  $t_3 = 15$  min). PB = Plasmabehandlung. Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ).

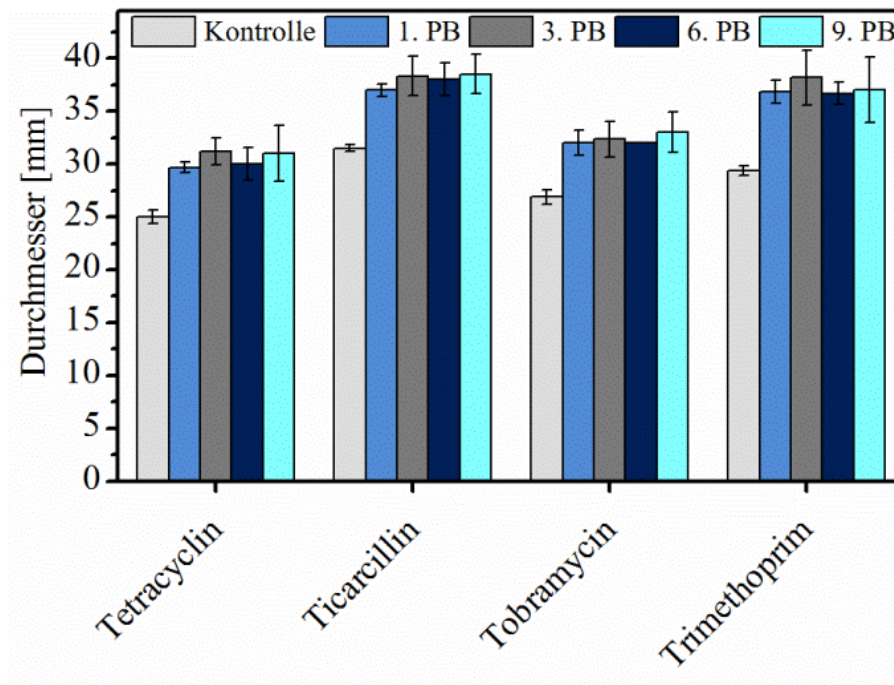
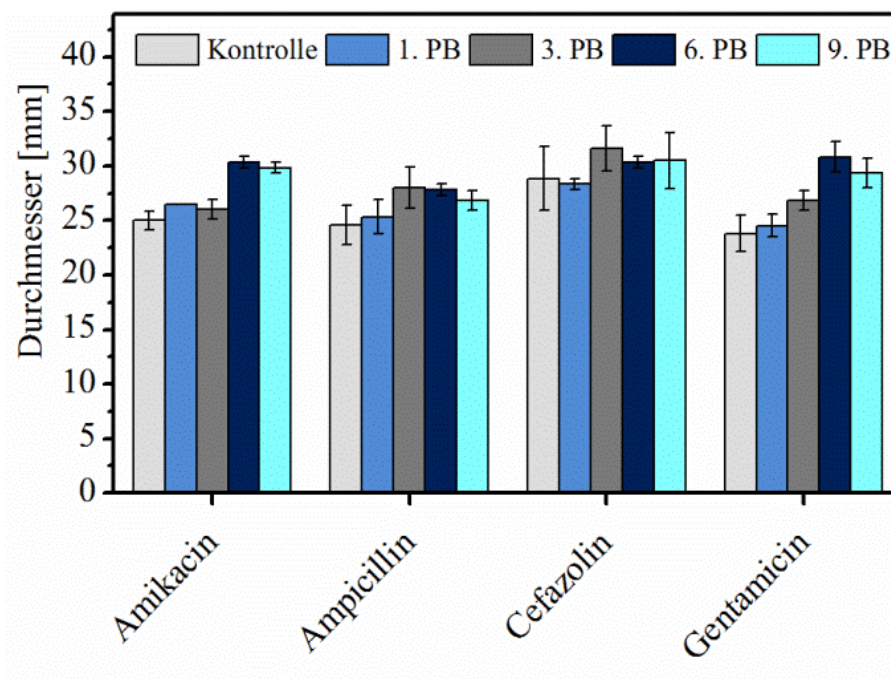


Abbildung 55: Durchmesser der Hemmhöfe [mm] von Tetracyclin, Ticarcillin, Tobramycin und Trimethoprim nach vorheriger Behandlung von *E. coli* mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen ( $t_1 = 1,5$  min;  $t_3 = 15$  min). PB = Plasmabehandlung. Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ).

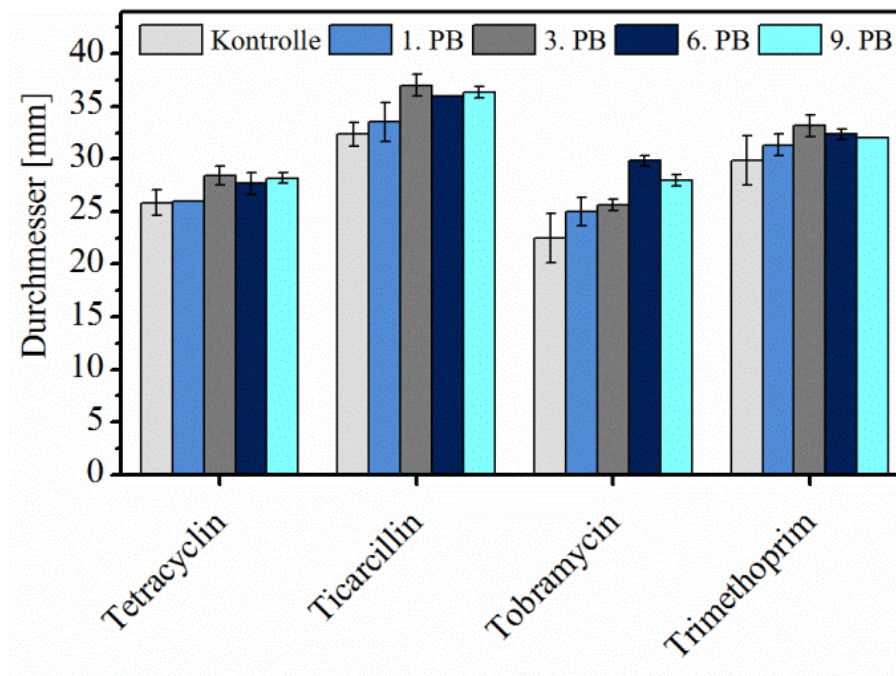
Mittelwert sind als Standardabweichungen wiedergegeben. Bei allen untersuchten Antibiotika zeigte sich, dass sich die Durchmesser der Hemmhöfe nach einer Vorbehandlung mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen vergrößern. Demzufolge nimmt die Sensibilität von *E. coli* gegenüber diesen Substanzen zu. Dieses Phänomen konnte für alle dargestellten Plasmabehandlungen (PB = 1, 3, 6 und 9) beobachtet werden. Eine Besonderheit zeigte sich bei Ampicillin, bei welchem sich nach PB 1 und PB 3 zunächst nur eine schwache und ab PB 6 eine sprunghafte Sensibilitätszunahme von *E. coli* zeigte. Erklären lassen sich diese Ergebnisse durch die in 3.2 ausgeführten reaktiven Spezies. Viele der gezeigten Moleküle sind in der Lage, Zellwandstrukturen, wie z.B. Doppelbindungen und Proteine, zu oxidieren. Dies führt dazu, dass die Zellwandintegrität abnimmt und Antibiotikamoleküle einfacher in die Zelle wandern können. Hier wechselwirken sie ungehindert mit ihren Targetstrukturen. Die sprunghafte Sensibilitätszunahme von *E. coli* gegenüber Ampicillin lässt sich vermutlich damit erklären, dass die Mechanismen der Zellwandsynthese durch die Mehrfachapplikation von CAP-behandelter NaCl-Lösung geschädigt werden.

In der Abbildung 56 und Abbildung 57 sind die Durchmesser der Hemmhöfe nach direkter Einwirkung von CAP auf die Bakteriensuspensionen dargestellt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindesten sechs voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen wiedergegeben.



**Abbildung 56:** Durchmesser der Hemmhöfe [mm] von Amikacin, Ampicillin, Cefazolin und Gentamicin nach direkter Behandlung der *E.-coli* Suspension mit CAP ( $t_1 = 3$  min,  $t_3 = 0$  min). Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ).

Wie bei der Vorbehandlung mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen konnte auch bei der direkten Behandlung eine Zunahme der Durchmesser ab PB 1 gezeigt werden. Jedoch war die gesteigerte Sensibilität von *E. coli* nicht so ausgeprägt wie bei der indirekten CAP-Behandlung. Ab der 6. PB konnte eine sprunghafte Zunahme der Empfindlichkeit bei den Wirkstoffen Amikacin, Gentamicin und Tobramycin beobachtet werden. Dies wurde durch ein Anwachsen der gemessenen Hemmhöfe ersichtlich. Amikacin, Gentamicin und Tobramycin sind Aminoglykosidantibiotika, die hemmend in den Prozess der Proteinbiosynthese von Bakterien eingreifen. Sie interagieren mit ribosomaler RNA (rRNA) und blockieren die Bildung von Proteinen<sup>(176)</sup>. Dies ist wahrscheinlich der Grund für die zunehmende Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber diesen Substanzen.



**Abbildung 57:** Durchmesser der Hemmhöfe [mm] von Tetracyclin, Ticarcillin, Tobramycin und Trimethoprim nach direkter Behandlung der *E.-coli* Suspension mit CAP ( $t_1 = 3$  min,  $t_3 = 0$  min). Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ).

Durch die direkte Plasmabehandlung wirkt, neben den in Abschnitt 5.3 beschriebenen reaktiven Spezies, UV-Strahlung auf die Bakteriensuspension. Es kann somit durch die wiederholte Plasmaeinwirkung u.a. zu einer UV-induzierten Mutation kommen, welche die Funktionsfähigkeit der Ribosomen bzw. die Struktur der rRNA verändert. Wenn nun Amikacin, Gentamicin und Tobramycin zusätzlich hemmend auf die Proteinsynthese wirken, ist dies ein additiver Effekt, der zur erhöhten Sensibilität von *E. coli* führt. Diese Vermutung müsste jedoch mit anderen Verfahren belegt werden. Erste Andeutungen auf mögliche mutagene Prozesse konnte die bereits oben beschriebene Genexpressionsanalyse zwar geben, jedoch nicht eindeutig belegen.

Zudem konnten, neben den hier dargestellten Ergebnissen, die Arbeiten von Boxhammer *et al.*<sup>(182)</sup>, Wende *et al.*<sup>(41)</sup>, Kluge *et al.*<sup>(183)</sup> und Maisch *et al.*<sup>(184)</sup> ebenfalls kein mutagenes Potential von CAP in Eukaryonten nachweisen. Die Tatsache, dass sich unterschiedliche Arbeitsgruppen mit der gleichen Fragestellung auseinandergesetzt haben und mit diversen Versuchsmethoden jeweils keine Beweise für ein mutagenes Potential aufzeigen konnten, verfestigt die Annahme, dass CAP in dieser Anwendungsform keine Mutationen in Eukaryoten und Prokaryoten hervorruft. Dies wiederum ist eine essentielle Voraussetzung für die Anwendung von CAP im medizinisch-therapeutischen Bereich.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Herstellung, Stabilität und Wirkungsweise von kalten atmosphärendruckplasmaaktivierten physiologischen Kochsalzlösungen untersucht. Dafür wurden folgende Themenkomplexe bearbeitet: 1. Vergleich zweier dielektrisch behinderter Oberflächenentladungen, 2. Einfluss des reaktiven Sauerstoffspezies- zu reaktiven Stickstoffspezies-Gehaltes (ROS/RNS-Gehaltes) auf die antimikrobiellen Effekte eines Plasmajets, 3. Atmosphärendruckplasmainduzierte Flüssigkeitschemie innerhalb wässriger Lösungen, 4. Biologische Wirkmechanismen plasmaassoziierten chemischer Moleküle, 5. Plasmabasierte Herstellung, Stabilisierung und Optimierung von antimikrobiell wirksamen Flüssigkeiten, 6. Microarraybasierte Genexpressionsanalyse und 7. Anwendung CAP-behandelter antimikrobiell wirksamer Lösungen.

Im Rahmen des ersten Themenkomplexes wurde eine neue, auf Keramik basierende DBE mit einer verbesserten Entladungsstabilität mit einer etablierten epoxidharzbasierten DBE verglichen. Hierbei sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich Veränderungen am verwendeten Material und an elektrischen Ansteuerungsparametern auf die Plasmaeigenschaften, die chemische Zusammensetzung der flüssigen Phase sowie die biologische Wirksamkeit auswirken. Durch den identischen geometrischen Aufbau beider DBEs waren vergleichende Untersuchungen entlang derselben Reaktionskaskade (Plasma → Gas → Flüssigkeit → Zelle) möglich. Das Plasma wurde hierzu mittels OES, die angrenzende Gas-Phase mittels FTIR-Spektroskopie, und anschließend die Flüssigkeit unter Nutzung photometrischer Methoden und pH-Wert-Messungen untersucht. Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden DBEs in der Gasphasen- und Flüssigkeitschemie. Die keramikbasierte DBE erzeugte höhere Konzentrationen an O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, HNO<sub>3</sub> und N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> als die epoxidharzbasierte DBE. Zusätzlich konnten nur in der Gasphase der epoxidharzbasierten DBE CO, CO<sub>2</sub> und HCOOH nachgewiesen werden. In der flüssigen wässrigen Phase erzeugte die keramikbasierte DBE höhere Konzentrationen von NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, während die epoxidharzbasierte DBE höhere

Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  generierte. Dennoch erzielten beide DBEs die gleichen biologischen Effekte und inaktivierten *E. coli* innerhalb weniger Minuten. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Quellencharakterisierung in dieser umfangreichen Form unerlässlich ist, um zu erwartende biologische Effekte realistisch einschätzen zu können. Zudem zeigte sich, dass dies gegenwärtig nicht allein auf der Basis plasmaphysikalischer und/oder plasmachemischer Tests erfolgen kann, sondern auch immer ein biologisches Testsystem benötigt wird. Weiterhin konnten mittels eines plasmaunabhängigen Suspensionsversuches in sauren NaCl-Lösungen niedrige pH-Werte als Ursache der antimikrobiellen Plasmaeffekte ausgeschlossen werden. Da zudem die Flüssigkeitschemie auch in Abwesenheit von Stickstoff durch CAP beeinflusst wurde und sich  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Moleküle bildeten sowie eine leichte Ansäuerung induziert wurde und darüber hinaus keine antimikrobiellen Effekte gefunden werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass ROS zwar einen Einfluss auf die Gasphasen- und Flüssigkeitschemie aber keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die antimikrobiellen Plasmaeffekte haben. Demzufolge scheinen für die keimreduzierende Wirkung von CAP RNS hauptverantwortlich zu sein.

Im zweiten Themenkomplex wurde untersucht, inwieweit der ROS/RNS-Gehalt einen Einfluss auf die antimikrobiellen Effekte hat. durch die Verwendung eines argonbetriebenen Plasmajets (kINPen 09) war es möglich, einen Gasschutzmantel von außen auf den kINPen 09 aufzubringen und über diesen die Zufuhr von  $\text{O}_2$  und  $\text{N}_2$  zum Plasma zu kontrollieren. Die Zusammensetzung der reaktiven Spezies in der Plasma-/Gasphase konnte somit eingestellt und der Einfluss des ROS/RNS-Gehaltes auf die Flüssigkeitschemie getestet werden. Quantitative Suspensionsversuche mit *E. coli* zeigten, dass Manipulationen der Zusammensetzung der reaktiven Spezies ( $\text{N}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Anteil) mit den antimikrobiellen Effekten der CAP-Behandlung korrelierten. Bei einer Gaszusammensetzung von 75 %  $\text{N}_2$  zu 25 %  $\text{O}_2$  wurde der stärkste antimikrobielle Effekt, die stärkste Ansäuerung, die höchsten Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen sowie die geringste  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration gefunden. Obwohl ROS eine geringere Rolle bei der direkten Inaktivierung von Mikroorganismen spielten, schienen sie essentieller Reaktionspartner für die reaktiven Stickstoffspezies zu sein, da in einer reinen  $\text{N}_2$ -Atmosphäre kein antimikrobieller Effekt nachweisbar war. Unter Berücksichtigung der Literatur kann daher davon ausgegangen werden, dass unter Schutzgasbedingungen, die der atmosphärischen Luft (20%  $\text{O}_2$ , 80%  $\text{N}_2$ ) ähnlich sind, Prokaryoten durch CAP inaktiviert werden können, ohne Eukaryoten einen wesentlichen Schaden zu zufügen.

Da die chemischen Wirkkomponenten, welche für die antimikrobiellen Effekte von CAP verantwortlich sind, derzeit noch nicht eindeutig geklärt sind, wurde im 3. Themenkomplex



untersucht, welche reaktiven Spezies durch CAP gebildet werden können. Basierend auf theoretischen Überlegungen zur plasmainduzierten Chemie wurde eine Vielzahl von Produkten, wie z.B.  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOOH}$  oder  $\text{ONOO}^-$  gefunden. Es wurde ersichtlich, dass sich die CAP-induzierte Flüssigkeitschemie durch ihre einzelnen Komponenten und untereinander möglichen Kreuzreaktionen komplex gestaltet und viele der in diesem Abschnitt dargestellten Reaktionen in antimikrobiell wirksamen Verbindungen resultieren könnten.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden im 4. Themenkomplex die biologischen Wirkungsmechanismen dieser Moleküle im Zusammenhang mit CAP betrachtet. Es wurden RNS, wie z.B.  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$  und  $\text{ONOOH}$ , als potentielle Hauptverursacher von DNA-Schäden und Zellwanddegeneration in Betracht gezogen und somit diese beiden Wirkmechanismen im Zusammenhang mit CAP herausgearbeitet. Neben der Identifizierung von reaktiven Spezies und Wirkmechanismen untermauern die dargelegten analytischen und mikrobiologischen Überlegungen den aktuellen Wissensstand, dass biologische Plasmaeffekte über das flüssige Medium auf die eukaryotische bzw. prokaryotische Zelle übertragen werden.

Aus den theoretischen Ausführungen in Abschnitt 4 ergab sich die Frage, ob DBEs zur Herstellung antimikrobiell wirksamer Flüssigkeiten verwendet werden können. Der 5. Abschnitt beschäftigte sich daher mit der Fragestellung, ob CAP-behandelte NaCl-Lösungen über eine Langzeitwirkung verfügen, oder ob sich die bakterizide Wirkung durch eine Verlängerung der Behandlungszeit stabilisieren lässt. Anhand quantitativer Suspensionsversuche mit *E. coli*, photometrischen Methoden und pH-Wert-Messungen wurde gezeigt, dass mittels CAP antimikrobiell aktive NaCl-Lösungen mit Kurz- und Langzeitwirkung hergestellt werden können. Die bakterizide Wirkung konnte hierbei durch eine Verlängerung der Behandlungszeit auf mindestens 5 min. stabilisiert werden. Zudem korrelierte die chemische Zusammensetzung positiv mit der antimikrobiellen Langzeitwirkung. Insbesondere gingen, im Widerspruch zu den vorherigen Ergebnissen, die antimikrobiellen Plasmaeffekte mit einem Überschuss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gegenüber  $\text{NO}_2^-$  einher. Daraus wurde geschlussfolgert, dass auch bei den antimikrobiellen Langzeiteffekten von CAP ROS, wie z.B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , eine untergeordnete, aber dennoch notwendige unterstützende Rolle neben RNS spielen. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch nicht bekannt.

Daher wurde im 6. Abschnitt das mögliche Zusammenspiel zwischen unterschiedlichen chemischen Agenzien und zellulär ablaufenden Prozessen untersucht. Mit Hilfe der Microarraybasierten Genexpressionsanalyse wurden Genexpressionsprofile von *E. coli* nach direkter und indirekter CAP-Behandlung aufgezeichnet. Veränderte Gene wurden entsprechend ihrer

Funktion in Gruppen zusammengefasst. Nach direkter und indirekter CAP-Behandlung wurden viele wichtige Gene hochreguliert, welche in der adaptiven Antwort auf oxidativen und nitrosativen Stress von Bakterien involviert sind. Da viele dieser Gene auf Superoxid, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und reaktive Stickstoffverbindungen, wie z.B.  $\text{ONOO}^-$ , reagieren, haben ROS und RNS einen maßgeblichen Anteil an den antimikrobiellen Effekten von Plasma. Die Aktivierung der SOS-Antwort durch CAP untermauert diese Annahme. Zudem gab die Aktivierung des Bam-Komplexes einen Hinweis darauf, dass CAP auch einen störenden Einfluss auf die Permeabilität der Membran und somit auf ihre Integrität ausübt. Weiterhin impliziert die Hochregulierung von SmpB eine mögliche Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese. Zudem wurde eine unerwartete Aktivierung des zellulären Stoffwechsels beobachtet, was auf noch völlig unbekannte Mechanismen hindeutet. Aufgrund der gefundenen Komplexität, mit der CAP auf Bakterienzellen einwirkt, kann davon ausgegangen werden, dass ROS und RNS ihre schädigenden Effekte kollektiv ausüben und dadurch die Ausbildung von Resistenzen gegen diese Form der Behandlung weiterhin unwahrscheinlich bleibt.

Im letzten Themenkomplex wurden denkbare Anwendungsgebiete für CAP-behandelte NaCl-Lösungen untersucht. Erstmals sollte das Wirkspektrum von CAP-behandelten NaCl-Lösungen bestimmt werden. Durch CAP-behandelte NaCl-Lösungen konnte die Anzahl der KbE bei *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* bereits nach 5 min bzw. 10 min Einwirkzeit bis unter die Nachweisgrenze reduziert werden. Nur *C. albicans* zeigte unsensibel gegenüber CAP-Behandlungen, da *C. albicans* ein Eukaryot ist, der über eine relativ stark ausgeprägte Resistenz gegenüber oxidativen Stress verfügt. Weiterhin wurde untersucht, ob sich trotz der komplexen Wirkmechanismen von CAP schnell Resistenzen ausbilden können. Hierzu wurden rekultivierte *E. coli* Bakterien wiederholt CAP-behandelten NaCl-Lösungen exponiert. Eine echte Resistenz von *E. coli* gegenüber CAP-behandelten NaCl-Lösungen konnte nicht nachgewiesen werden. Es wurde daher weiterführend geprüft, ob eine Kombinationstherapie von CAP-behandelten NaCl-Lösungen mit handelsüblichen Antibiotika zu einer veränderten Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber letzteren führt. Daher wurden Antibiotogramme für Amikacin, Ampicillin, Cefazolin, Gentamicin, Tetracyclin, Ticarcillin, Tobramycin und Trimethoprim aufgezeichnet. Bei allen untersuchten Antibiotika vergrößerten sich die Durchmesser der Hemmhöfe nach einer Vorbehandlung mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen, was für eine Zunahme der von *E. coli* gegenüber diesen Substanzen spricht und vermutlich auf eine abnehmende Zellwandintegrität und ein vereinfachtes Einwandern der Antibiotikamoleküle in die Zelle zurückzuführen ist. CAP-behandelte NaCl-Lösungen könnten durchaus ein großes Potential für eine medizinische Anwendung haben.

## 7 Ausblick

Die beschriebenen Versuche und dargestellten Ergebnisse geben einen vielseitigen ersten Überblick über die komplexen physikalischen, chemischen und biologischen Prozesse, welche durch CAP induziert werden können. Um die Wirkmechanismen von Plasma weiter zu klären und das medizinische Anwendungspotential noch besser einschätzen zu können, sind weiterführende Untersuchungen in vielen der dargelegten Bereichen sinnvoll.

Da die Flüssigkeit bei der Übermittlung der Plasmawirkung auf die Zelle eine Schlüsselrolle einnimmt, wären weitere Analysen zur Chemie mit Hilfe von HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie), Redoxmessungen sowie Ionenchromatographie mit nachgeschalteten Massenspektrometer sinnvoll. Mit Hilfe dieser Methoden könnten die hier gefundenen Ergebnisse zur Flüssigkeitschemie weiter verifiziert und/oder im besten Fall durch die Identifizierung von noch unbekannten oder theoretisch angenommenen Molekülen die Wirkmechanismen von CAP weiter aufgeklärt werden. Neben der Entschlüsselung der chemischen Aspekte bei der Wirkungsweise von CAP würden zusätzliche Versuche auf zellulärer Ebene dazu beitragen die exakten Mechanismen im biologischen System zu identifizieren. Mit Hilfe der real time PCR (Polymerasekettenreaktion) könnten zunächst die hier dargestellten Ergebnisse zur Genexpressionsanalyse bestätigt werden. Eine nachfolgende Proteomanalyse würde einen noch tieferen Einblick in die posttranskriptionalen metabolischen Prozesse der Zelle geben und maßgeblich dabei behilflich sein die Wirkungsweise von CAP auch auf dieser Ebene zu enträtseln.

Ein Aspekt dieser Arbeit waren die Untersuchungen zur Anwendung CAP-behandelter antimikrobiell wirksamer Lösungen, wobei die gewonnenen Ergebnisse ein recht vielversprechendes Anwendungspotential für diese Flüssigkeiten offenbarten. Daher wäre es wünschenswert für CAP-behandelte antimikrobiell wirksame Lösungen reale Anwendungsnischen zu finden, wie sie z.B. bereits in der Diskussion für die Wundtherapie oder Gewebetransplantation vorgeschlagen wurden. Einhergehend mit diesem Ziel wäre eine Hochskalierung des Probevolumens von 5 ml auf mehrere 100 ml erstrebenswert. Daher sollte zukünftig eine Plasmaanlage entwickelt werden, die die Behandlung von deutlich höheren Probelvolumen erlaubt und entsprechend DIN SPEC 91315 charakterisiert ist. Zudem sollten die hier weiterhin beschriebenen Verfahren zur Testung dieser Plasmaanlage herangezogen werden.

Eine weitere in diesem Zusammenhang noch offene Fragestellung ist, ob CAP-behandelte Lösungen perspektivisch vom BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) oder anderen Zulassungsbehörden als Medizinprodukte oder Arzneimittel eingestuft werden. Im



Fall von Medizinprodukten dürfen diese nur dann in den Verkehr gebracht oder in Betrieb genommen werden, wenn sie mit der CE-Kennzeichnung versehen sind. Diese darf angebracht werden, wenn das entsprechende Medizinprodukt ein vorgeschriebenes Konformitätsbewertungsverfahren durchlaufen und die grundlegenden Anforderungen erfüllt hat. Im Fall, dass CAP-behandelte NaCl-Lösungen als Arzneimittel eingestuft werden, müssten diese vor der Vermarktung ein Zulassungsverfahren durchlaufen, das neben einer Vielzahl von in-vitro und in-vivo Test auch drei gut koordinierte klinische Phasen umfasst. Erfahrungsgemäß sind Zulassungsverfahren von neuen Arzneimitteln weit aufwendiger, langsamer und kostenintensiver als die Konformitätsbewertung eines neuen Medizinproduktes. Daher ist es wichtig diese offene Frage zeitnah zu klären und die entsprechenden Weichen zu stellen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. von Woedtke T, Reuter S, Masur K, Weltmann K-D. Plasma for medicine. *Physics Report*. 2013;530(4):291-320.
2. Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Dijk Jv, et al. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phys*. 2009;11.
3. von Woedtke T, Weltmann KD. Grundlagen der Plasmamedizin. *Der MKG-Chirurg*. 2016;9(4):246-54.
4. Tendero C, Tixier C, Tristant P, Desmaison J, Leprince P. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2006;61(1):2-30.
5. Morfill G, Kong MG, Zimmermann J. Focus on plasma medicine. *New J Phys*. 2009;11(11):115011.
6. Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann JL, et al. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2010;8(12):968-76.
7. von Woedtke T, Haertel B, Weltmann KD, Lindequist U. Plasma pharmacy - physical plasma in pharmaceutical applications. *Pharmazie*. 2013;68:492-8.
8. Ehlbeck J, Schnabel U, Polak M, Winter J, von Woedtke T, Brandenburg R, et al. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *J Phys D: Appl Phys*. 2010;44(1):013002.
9. von Woedtke T, Weltmann KD. Plasmamedizin – medizinische Anwendung von physikalischem Plasma. *HygMed*. 2013;38-5:180-5.
10. O'Connor N, Cahill O, Daniels S, Galvin S, Humphreys H. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? *J Hosp Infect*. 2014;88(2):59-65.
11. Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma processes and polym*. 2005;2(5):391-400.
12. Shintani H, Sakudo A, Burke P, McDonnell G. Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action (Review). *Exp. Ther. Med*. 2010;1(5):731-8.
13. Bundscherer L, Nagel S, Hasse S, Tresp H, Wende K, Walther R, et al. Non-thermal plasma treatment induces MAPK signaling in human monocytes. *Open Chem*. 2015;13(1).
14. Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann. Biomed. Eng*. 2010;38(3):748-57.

15. Barton A, Wende K, Bundscherer L, Hasse S, Schmidt A, Bekeschus S, et al. Nonthermal Plasma Increases Expression of Wound Healing Related Genes in a Keratinocyte Cell Line. *PlasmaMed*. 2013;3(1-2).
16. Isbary G, Morfill G, Schmidt H, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, et al. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br. J. Dermatol*. 2010;163(1):78-82.
17. Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann J, Morfill G, Schmidt HU, et al. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol*. 2012;167(2):404-10.
18. Isbary G, Zimmermann J, Shimizu T, Li YF, Morfill GE, Thomas HM, et al. Non-thermal plasma - more than five years of clinical experience. *Clinical Plasma Medicine*. 2013;1(1):19-23.
19. Daeschlein G, Scholz S, Ahmed R, von Woedtke T, Haase H, Niggemeier M, et al. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *Journal of Hospital Infection*. 2012;81(3):177-83.
20. Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med. Gas Res*. 2013;3(1):1.
21. Schlegel J, Köritzer J, Boxhammer V. Plasma in cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine*. 2013;1(2):2-7.
22. Emmert S, Isbary G, Kluschke F, Lademann J, Podmelle F, Metelmann HR, et al. Clinical plasma medicine - position and perspectives in 2012: paper of consent, result of the workshop "Clinical Concepts in Plasma Medicine", Greifswald April 28th, 2012. *Clinical Plasma Medicine*. 2013;1(1):3-4.
23. Machala Z, Tarabova B, Hensel K, Spetlikova E, Sikurova L, Lukes P. Formation of ROS and RNS in Water Electro-Sprayed through Transient Spark Discharge in Air and their Bactericidal Effects. *Plasma Process Polym*. 2013;10(7):649-59.
24. Lukes P, Locke BR, Brisset J-L. Aqueous-Phase Chemistry of Electrical Discharge Plasma in Water and in Gas-Liquid Environment. In: Parvulescu VI, Magureanu M, Lukes P, editors. *Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids*. 1. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012. p. 243-308.
25. Lukes P, Locke BR, Brisset J-L. Biological Effects of Electrical Discharge Plasma in Water and in Gas-Liquid Environments. In: Parvulescu VI, Magureanu M, Lukes P, editors. *Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids*. 1. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012. p. 309-52.
26. Lukes P, Dolezalova E, Sisrova I, Clupek M. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation

- of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . *Plasma Sources Sci. Technol.* 2014;23(1):15.
27. Oehmigen K, Hoder T, Wilke C, Brandenburg R, Hähnel M, Weltmann KD, et al. Volume Effects of Atmospheric-Pressure Plasma in Liquids. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2011;39(11):2646-7.
28. Oehmigen K, Winter J, Hähnel M, Wilke C, Brandenburg R, Weltmann KD, et al. Estimation of Possible Mechanisms of *Escherichia coli* Inactivation by Plasma Treated Sodium Chloride Solution. *Plasma Process Polym.* 2011;8(10):904-13.
29. Oehmigen K. Plasma-Flüssigkeits-Wechselwirkungen, unveröffentlichte Dissertation. Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald 2013.
30. Gils CAJ, Hofmann S, Boekema BKHL, Brandenburg R, Bruggeman PJ. Mechanisms of bacterial inactivation in liquid phase induced by a remote RF cold atmospheric pressure plasma jet. *J Phys D: Appl Phys.* 2013;46(17):1-14.
31. Tian W, Kushner MJ. Atmospheric pressure dielectric barrier discharges interacting with liquid covered tissue. *J Phys D: Appl Phys.* 2014;47(16):21.
32. Naitali M, Kamgang-Youbi G, Herry JM, Bellon-Fontaine MN, Brisset JL. Combined Effects of Long-Living Chemical Species during Microbial Inactivation Using Atmospheric Plasma-Treated Water. *Appl Environ Microb.* 2010;76(22):7662-4.
33. Kamgang-Youbi G, Herry JM, Meylheuc T, Brisset JL, Bellon-Fontaine MN, Doubra A, et al. Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009;48(1):13-8.
34. Brisset JL, Hnatiuc E. Peroxyxynitrite: A Re-examination of the Chemical Properties of Non-thermal Discharges Burning in Air Over Aqueous Solutions. *Plasma Chem Plasma Process.* 2012;32(4):655-74.
35. Reuter S, Tresp H, Wende K, Hammer MU, Winter J, Masur K, et al. From RONS to ROS: tailoring plasma jet treatment of skin cells. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2012;40(11):2986-93.
36. Winter J, Tresp H, Hammer M, Iseni S, Kupsch S, Schmidt-Bleker A, et al. Tracking plasma generated  $\text{H}_2\text{O}_2$  from gas into liquid phase and revealing its dominant impact on human skin cells. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2014;47(28):285401.
37. Bundscherer L, Wende K, Ottmüller K, Barton A, Schmidt A, Bekeschus S, et al. Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK signaling pathways of human immune cell lines. *Immunobiology.* 2013;218(10):1248-55.

- 
38. Wende K, Barton A, Bekeschus S, Bundscherer L, Schmidt A, Weltmann KD, et al. Proteomic tools to characterize non-thermal plasma effects in eukaryotic cells. *Plasma-Med.* 2013;3(1-2).
  39. Schmidt A, Wende K, Bekeschus S, Bundscherer L, Barton A, Ottmüller K, et al. Non-thermal plasma treatment is associated with changes in transcriptome of human epithelial skin cells. *Free Radical Res.* 2013;47(8):577-92.
  40. Wende K, Straßenburg S, Haertel B, Harms M, Holtz S, Barton A, et al. Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in HaCaT keratinocytes and influences cell physiology. *Cell Biol. Int.* 2014;38(4):412-25.
  41. Wende K, Bekeschus S, Schmidt A, Jatsch L, Hasse S, Weltmann K, et al. Risk assessment of a cold argon plasma jet in respect to its mutagenicity. *Mutat. Res.* 2016;798:48-54.
  42. Schmidt A, von Woedtke T, Weltmann KD, Masur K. Identification of the Molecular Basis of Non-thermal Plasma-Induced Changes in Human Keratinocytes. *PlasmaMed.* 2013;3(1-2):15-25.
  43. Schmidt A, Dietrich S, Steuer A, Weltmann KD, von Woedtke T, Masur K, et al. Non-Thermal Plasma Activates Human Keratinocytes by Stimulation of Antioxidant and Phase II Pathways. *J. Biol. Chem.* 2015;jbc. M114. 603555.
  44. Strassenburg S, Greim U, Bussiahn R, Haertel B, Wende K, von Woedtke T, et al. Comparison of biological effects on human keratinocytes using different plasma treatment regimes. *PlasmaMed.* 2013;3(1-2).
  45. Winter J, Wende K, Masur K, Iseni S, Dünnebier M, Hammer MU, et al. Feed gas humidity: a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells. *J Phys D: Appl Phys.* 2013;46:1-11.
  46. Kamgang-Youbi G, Herry JM, Brisset JL, Bellon-Fontaine MN, Doubla A, Naïtali M. Impact on disinfection efficiency of cell load and of planktonic/adherent/detached state: case of *Hafnia alvei* inactivation by Plasma Activated Water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;81(3):449-57.
  47. Traylor MJ, Pavlovich MJ, Karim S, Hait P, Sakiyama Y, Clark DS, et al. Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water. *J Phys D: Appl Phys.* 2011;44(47):1-4.
  48. Julák J, Scholtz V, Kotucova S, Janouskova O. The persistent microbicidal effect in water exposed to the corona discharge. *Phys Medica.* 2012;28(3):230-9.
  49. Hänsch MA, Mann M, Weltmann KD, von Woedtke T. Analysis of antibacterial efficacy of plasma-treated sodium chloride solutions. *J Phys D: Appl Phys.* 2015;48(45):454001.

50. Thomas L, Maillard JY, Lambert R, Russell A. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a 'residual' concentration. *J Hosp Infect.* 2000;46(4):297-303.
51. Willingham EM, Sander JE, Thayer SG, Wilson JL. Investigation of bacterial resistance to hatchery disinfectants. *Avian Dis.* 1996:510-5.
52. The European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2012.
53. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization; 2014. p. 257.
54. Oehmigen K, Hähnel M, Brandenburg R, Wilke C, Weltmann KD, von Woedtke T. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. *Plasma Process Polym.* 2010;7(3-4):250-7.
55. Atiyeh BS, Dibo SA, Hayek SN. Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing. *Int Wound J.* 2009;6(6):420-30.
56. Dulecki M, Pieper B. Irrigating simple acute traumatic wounds: a review of the current literature. *J Emerg Nurs.* 2005;31(2):156-60.
57. Luedtke-Hoffmann KA, Schafer DS. Pulsed lavage in wound cleansing. *Phys Ther.* 2000;80(3):292-300.
58. Moscati R, Mayrose J, Fincher L, Jehle D. Comparison of normal saline with tap water for wound irrigation. *Am J Emerg Med.* 1998;16(4):379-81.
59. DIN Deutsches Institut für Normung e.V. DIN SPEC 91315 "Allgemeine Anforderungen an medizinische Plasmaquellen". Beuth Verlag Berlin; 2014.
60. Mann MS, Tiede R, Gavenis K, Daeschlein G, Bussiahn R, Weltmann KD, et al. Introduction to DIN-specification 91315 based on the characterization of the plasma jet kINPen® MED. *Clinical Plasma Medicine.* 2016;4(2):35-45.
61. Jablonowski H, von Woedtke T. Research on plasma medicine-relevant plasma-liquid interaction: What happened in the past five years? *Clinical Plasma Medicine.* 2015;3(2):42-52.
62. Bruggeman P, Kushner MJ, Locke BR, Gardeniers J, Graham W, Graves DB, et al. Plasma-liquid interactions: a review and roadmap. *Plasma Sources Sci. Technol.* 2016;25(5):053002.
63. Ligon BL, editor *Penicillin: its discovery and early development. Seminars in pediatric infectious diseases*; 2004: Elsevier.

- 
64. Nayler JH. Early discoveries in the penicillin series. *Trends Biochem. Sci.* 1991;16:195-7.
  65. Davies J. Where have all the antibiotics gone? *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2006;17(5):287-90.
  66. Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):293-7.
  67. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States. 2013.
  68. Lewis K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature.* 2012;485(7399):439-40.
  69. Hänsch M, Winter J, Bussiahn R, Weltmann KD, von Woedtke T. A systematic characterization of a novel surface dielectric barrier discharge for biomedical experiments. *PlasmaMed.* 2013;3(1-2):27-44.
  70. Weltmann KD, Kindel E, Brandenburg R, Meyer C, Bussiahn R, Wilke C, et al. Atmospheric pressure plasma jet for medical therapy: Plasma parameters and risk estimation. *Contrib Plasma Phys.* 2009;49(9):631-40.
  71. Reuter S, Winter J, Schmidt-Bleker A, Tresp H, Hammer MU, Weltmann KD. Controlling the ambient air affected reactive species composition in the effluent of an argon plasma jet. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2012;40(11):2788-94.
  72. Fricke K, Koban I, Tresp H, Jablonowski L, Schröder K, Kramer A, et al. Atmospheric Pressure Plasma: A High-Performance Tool for the Efficient Removal of Biofilms. *Plos one.* 2012;7(8).
  73. Rothman LS, Jacquemart D, Barbe A, Benner DC, Birk M, Brown L, et al. The HITRAN 2004 molecular spectroscopic database. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.* 2005;96(2):139-204.
  74. Widmer H. Mikrobiologie und Infektiologie für Ärzte und Apotheker. WVG Stuttgart. 1992.
  75. Leistner E, Breckle SW. Pharmazeutische Biologie: Grundlagen und Systematik: Thieme; 2000.
  76. Neumeister B, Geiss H, Braun R, Kimmig P. Mikrobiologische Diagnostik. Stuttgart, German: Thieme Verlag KG. 2009.
  77. NIH – National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Available from: [http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/publicmedia/Pages/image\\_library.aspx](http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/publicmedia/Pages/image_library.aspx).

78. Blattner FR, Plunkett GI, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete Genom Sequence of *Escherichia coli* K-12. Science. 1997;277.
79. Brock T, Madigan J, Martinko J, Parker J. Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin-Heidelberg; 2000.
80. Bachmann BJ. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed ASM Press, Washington, DC. 1996:2460-88.
81. DIN EN 1500:2013-07. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Hygienische Händedesinfektion - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 1500:2013. 2013.
82. Jensen KF. The *Escherichia coli* K-12 "Wild Types" W3110 and MG1655 Have an *rph* Frameshift Mutation That Leads to Pyrimidine Starvation Due to Low *pyrE* Expression Levels. J Bacteriol. 1993;175(10):3401-7.
83. Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kränzler H, Batzilla C, Kozitskaya S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. Int. J. Antimicrob. Agents. 2006;28:14-20.
84. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. Microbes Infect. 2002;4(4):481-9.
85. Schoenfelder SM, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W. Success through diversity—how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. Int. J. Med. Microbiol. 2010;300(6):380-6.
86. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect. 2000;2(9):1051-60.
87. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Medecine et maladies infectieuses. 2006;36(2):78-91.
88. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 1983;5(2):279-313.
89. Bast E. Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken: Spektrum, Akad. Verlag; 2001.
90. Gebel J, Werner H, Kirsch-Altena A, Bansemir K. Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren. mhp. Wiesbaden; 2001.
91. Reybrouck G. The testing of disinfectants. Int. Biodeterior. Biodegrad. 1998;41(3):269-72.



- 
92. von Woedtke T, Kramer A, Weltmann KD. Plasma Sterilization: What are the Conditions to Meet this Claim. *Plasma Process Polym.* 2008;5(6):534-9.
  93. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Desinfektionsmittel-Liste der DGHM. Germany: Desinfektionsmittel-Kommission der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; 2002.
  94. Schwebke I, Rabenau HF. Aktueller Stand zur Viruzidieprüfung—ein Überblick. 2012.
  95. Oelmüller U, Krüger N, Steinbüchel A, Friedrich CG. Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J Microbiol Meth.* 1990;11:73-84.
  96. Bruggeman P, Brandenburg R. Atmospheric pressure discharge filaments and microplasmas: physics, chemistry and diagnostics. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2013;46(46):464001.
  97. Möller D. Luft: Chemie, Physik, Biologie, Reinhaltung, Recht: Walter de Gruyter; 2003.
  98. Etoh H, Ono Y, Ogino A, Nagatsu M. Low-temperature sterilization of wrapped materials using flexible sheet-type dielectric barrier discharge. *Appl Phys Lett.* 2008;93(22):221502-1--3.
  99. Sakiyama Y, Graves DB, Chang H-W, Shimizu T, Morfill GE. Plasma chemistry model of surface microdischarge in humid air and dynamics of reactive neutral species. *J Phys D: Appl Phys.* 2012;45:1-19.
  100. Holleman AF, Wiberg N. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Berlin, Germany: Walter de Gruyter & Co.; 2007.
  101. Ehlers E. Kurzlehrbuch Allgemeine und anorganische Chemie. Germany: Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 2003.
  102. Machala Z, Chládeková L, Pelach M. Plasma agents in bio-decontamination by dc discharge in atmospheric air. *J Phys D: Appl Phys.* 2010;43(22):1-22.
  103. Fang FC. Perspectives Series: Host/Pathogen Interactions, Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. *J Clin Invest.* 1997;99(12):2818-25.
  104. Ikawa S, Kitano K, Hamaguchi S. Effects of pH on Bacterial Inactivation in Aqueous Solutions due to Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma Application. *Plasma Processes Polym.* 2010;7(1):33-42.
  105. Malik MA, Ghaffar A, Malik SA. Water purification by electrical discharges. *Plasma Sources Sci Technol.* 2001;10(1):82-91.

106. Liu F, Sun P, Bai N, Tian Y, Zhou H, Wei S, et al. Inactivation of Bacteria in an Aqueous Environment by a Direct-Current, Cold-Atmospheric-Pressure Air Plasma Microjet. *Plasma Process Polym.* 2010;7(3-4):231–6.
107. Dodet B, Odic E, Goldman A, Goldman M, Renard D. Hydrogen Peroxide Formation by Discharges in Argon/Water Vapor Mixtures at Atmospheric Pressure. *J Adv Oxid Technol.* 2005;8(1):91-7.
108. Yu XY, Barker JR. Hydrogen peroxide photolysis in acidic aqueous solutions containing chloride ions. II. Quantum yield of OH<sub>(Aq)</sub> radicals. *J Phys Chem A.* 2003;107(9):1325-32.
109. Nakamura K, Kanno T, Mokudai T, Iwasawa A, Niwano Y, Kohno M. Microbial resistance in relation to catalase activity to oxidative stress induced by photolysis of hydrogen peroxide. *Mirobiol Immunol.* 2012;56(1):48-55.
110. Ikai H, Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Iwasawa A, Sasaki K, et al. Photolysis of Hydrogen Peroxide, an Effective Disinfection System via Hydroxyl Radical Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(12):5086-91.
111. Wilks JC, Slonczewski JL. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: Rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J Bacteriol.* 2007;189(15):5601-7.
112. Jablonowski H, Hänsch MAC, Dünnebier M, Wende K, Hammer MU, Weltmann KD, et al. Plasma jet's shielding gas impact on bacterial inactivation. *Biointerphases.* 2015;10(2):029506.
113. Pavlovich MJ, Clark DS, Graves DB. Quantification of air plasma chemistry for surface disinfection. *Plasma Sources Sci. Technol.* 2014;23(6):065036.
114. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8(10):813-24.
115. Volkert MR, Elliott NA, Housman DE. Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97(26):14530-5.
116. Mack J, Bolton JR. Photochemistry of nitrite and nitrate in aqueous solution: a review. *J Photoch Photobio A.* 1999;128:1-13.
117. Attri P, Kim YH, Park DH, Park JH, Hong YJ, Uhm HS, et al. Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis. *Sci. Rep.* 2015;5.
118. Dukan S, Touati D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: Resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress *J Bacteriol.* 1996;178(21):6145–50.

- 
119. Lauer WC, Sanchez FJ. Disinfection of pipelines and storage facilities field guide: American Water Works Association; 2006.
  120. Ronco C, Mishkin GJ, eds. Disinfection by sodium hypochlorite: dialysis applications: Karger Medical and Scientific Publishers; 2007.
  121. Wende K, Williams P, Dalluge J, van Gaens W, Aboubakr H, Bischof J, et al. Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet. *Biointerphases*. 2015;10(2):029518.
  122. Winter T, Winter J, Polak M, Kusch K, Mader U, Sietmann R, et al. Characterization of the global impact of low temperature gas plasma on vegetative microorganisms. *Proteomics*. 2011;11(17):3518-30.
  123. Winter T, Bernhardt J, Winter J, Mäder U, Schlüter R, Weltmann KD, et al. Common versus noble *Bacillus subtilis* differentially responds to air and argon gas plasma. *Proteomics*. 2013;13(17):2608–21.
  124. Machala Z, Jedlovsky I, Chladekova L, Pongrac B, Gierl D, Janda M, et al. DC discharges in atmospheric air for bio-decontamination - spectroscopic methods for mechanism identification. *Eur Phys J D*. 2009;54(2):195-204.
  125. Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *J Phys D: Appl Phys*. 2012;45(26):1-42.
  126. Lackmann JW, Schneider S, Edengeiser E, Jarzina F, Brinckmann S, Steinborn E, et al. Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *J R Soc Interface*. 2013;10(89).
  127. Yusupov M, Huygh ABS, Snoeckx R, van Duin ACT, Neyts EC. Plasma-induced destruction of bacterial cell wall components: A reactive molecular dynamics simulation. *J Phys Chem C*. 2013;117(11):5993-8.
  128. Kobayashi Y, Hayashi M, Yoshino F, Tamura M, Yoshida A, Ibi H, et al. Passive ultrasonic irrigation in the presence of a low concentration of hydrogen peroxide enhances hydroxyl radical generation and bactericidal effect against *Enterococcus faecalis* *J Oral Sci*. 2014;56(1):35-9.
  129. Raffellini S, Schenk M, Guerrero S, Alzamora SM. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation employing hydrogen peroxide at varying temperatures, pH and concentrations. *Food Control*. 2011;22(6):920-32.
  130. Raffellini S, Guerrero S, Alzamora SM. Effect of hydrogen peroxide concentration and pH on inactivation kinetics of *Escherichia coli*. *J Food Safety*. 2008;28(4):514-33.

131. Deupree SM, Schoenfisch MH. Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on Gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomater.* 2009;5(5):1405-15.
132. Pacelli R, Wink DA, Cook JA, Krishna MC, DeGraff W, Friedman N, et al. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 1995;182(5):1469-79.
133. Schapiro JM, Libby SJ, Fang FC, editors. Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. 8 July 2003.
134. Woodmansee AN, Imlay JA. A mechanism by which nitric oxide accelerates the rate of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2003;49(1):11-22.
135. Watts RJ, Washington D, Howsawkung J, Loge FJ, Teel AL. Comparative toxicity of hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and superoxide anion to *Escherichia coli*. *Adv Environ Res.* 2003;7(4):961-8.
136. Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Darley-Usmar VM. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in Nitric Oxide biology. *J Biol Chem.* 2010;285(26):19699-704.
137. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence.* 2012;3(3):271-9.
138. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(10):820-32.
139. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of Superoxide and Nitric Oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288(2):481-7.
140. Pryor WA, Cueto R, Jin X, Koppenol WH, Nguschwemlein M, Squadrito GL, et al. A practical method for preparing peroxynitrite solutions of low ionic-strength and free of hydrogen-peroxide. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(1):75-83.
141. Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* 1995;364(3):279-82.
142. Zhu L, Gunn C, Beckman JS. Bactericidal Activity of Peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1992;298(2):452-7.
143. Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: A Biologically Significant Oxidant. *Gen Pharmacol.* 1998;31(2):179-86.
144. Lobachev VL, Rudakov ES. The chemistry of peroxynitrite. Reaction mechanisms and kinetics. *Russ Chem Rev.* 2006;75(5):375-96.

- 
145. Alvarez B, Denicola A, Radi R. Reaction between peroxynitrite and hydrogen peroxide: formation of oxygen and slowing of peroxynitrite decomposition. *Chem Res Toxicol.* 1995;8(6):859–64.
  146. Brons HJ, Zehnder AJ. Aerobic nitrate and nitrite reduction in continuous cultures of *Escherichia coli* E4. *Arch. Microbiol.* 1990;153(6):531-6.
  147. Weller R, Price RJ, Ormerod AD, Benjamin N, Leifert C. Antimicrobial effect of acidified nitrite on dermatophyte fungi, *Candida* and bacterial skin pathogens. *J Appl Microbiol.* 2001;90(4):648-52.
  148. Sharma A, Collins G, Pruden A. Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *J. Appl. Microbiol.* 2009;107(5):1440-9.
  149. Joshi SG, Yost A, Joshi SS, Addya S, Ehrlich G, Brooks A. Microarray analysis of transcriptomic response of *Escherichia coli* to nonthermal plasma-treated PBS solution. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2015;6:49-62.
  150. Simmons LA, Foti JJ, Cohen SE, Walker GC. The SOS regulatory network. *EcoSal Plus.* 2008;2008.
  151. Michel B. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol.* 2005;3(7):e255.
  152. Janion C. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci.* 2008;4(6):338-44.
  153. Lushchak VI. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 2011;153(2):175-90.
  154. Scandalios JG. Oxidative stress responses-what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol.* 2002;3(7):1.
  155. Wu J, Weiss B. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1991;173(9):2864-71.
  156. Storz G, Imlay JA. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999;2(2):188-94.
  157. Spiro S. Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 2006;34(1):200-2.
  158. Chiang SM, Schellhorn HE. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012;525(2):161-9.
  159. Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 1991;55(4):561-85.

160. Seaver LC, Imlay JA. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2001;183(24):7173-81.
161. Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. Nature. 2000;407(6801):211-5.
162. Zeller T, Klug G. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. Naturwissenschaften. 2006;93(6):259-66.
163. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nat. Biotechnol. 2004;22(11):1399-408.
164. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. Free Radic Biol Med. 2014;66:75-87.
165. Anjem A, Varghese S, Imlay JA. Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 2009;72(4):844-58.
166. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000;64(4):672-93.
167. Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. J. Bacteriol. 1999;181(21):6573-84.
168. Bonnefoy V, Demoss JA. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. Antonie Van Leeuwenhoek. 1994;66(1):47-56.
169. Rigel NW, Schwalm J, Ricci DP, Silhavy TJ. BamE modulates the *Escherichia coli* beta-barrel assembly machine component BamA. J. Bacteriol. 2012;194(5):1002-8.
170. Hallier M, Ivanova N, Rametti A, Pavlov M, Ehrenberg M, Felden B. Pre-binding of small protein B to a stalled ribosome triggers trans-translation. J. Biol. Chem. 2004;279(25):25978-85.
171. Jamieson DJ, Stephen DW, Terrière EC. Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Lett. 1996;138(1):83-8.
172. Brown AJ, Haynes K, Quinn J. Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. Curr. Opin. Microbiol. 2009;12(4):384-91.
173. Richardson AR, Dunman PM, Fang FC. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. Mol. Microbiol. 2006;61(4):927-39.
174. Lewis A, Matzdorf S, Endres J, Windham I, Bayles KW, Rice K. Examination of the *Staphylococcus aureus* nitric oxide reductase (saNOR) reveals its contribution to

- modulating intracellular NO levels and cellular respiration. *Mol. Microbiol.* 2015;96(3):651-69.
175. Richardson AR, Libby SJ, Fang FC. A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science.* 2008;319(5870):1672-6.
176. Semchyshyn H, Bagnyukova T, Lushchak V. Involvement of soxRS regulon in response of *Escherichia coli* to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Biochemistry (Moscow).* 2005;70(11):1238-44.
177. Kumar SR, Imlay JA. How *Escherichia coli* tolerates profuse hydrogen peroxide formation by a catabolic pathway. *J Bacteriol.* 2013;195(20):4569-79.
178. Zimmermann J, Shimizu T, Schmidt H, Li Y, Morfill G, Isbary G. Test for bacterial resistance build-up against plasma treatment. *New J. Phys.* 2012;14(7):073037.
179. Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin. Infect. Dis.* 2009;49(10):1541-9.
180. Howell-Jones R, Wilson M, Hill KE, Howard A, Price PE, Thomas DW. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;55(2):143-9.
181. Bowler P, Duerden B, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001;14(2):244-69.
182. Boxhammer V, Li Y, Köritzer J, Shimizu T, Maisch T, Thomas H, et al. Investigation of the mutagenic potential of cold atmospheric plasma at bactericidal dosages. *Mutat. Res.* 2013;753(1):23-8.
183. Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H, et al. Investigating the mutagenicity of a cold argon-plasma jet in an HET-MN model. *PloS one.* 2016;11(9):e0160667.
184. Maisch T, Bosserhoff A, Unger P, Heider J, Shimizu T, Zimmermann J, et al. Investigation of toxicity and mutagenicity of cold atmospheric argon plasma. *Environ. Mol. Mutagen.* 2017;58(3):172-7.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele zweier bereits zugelassener Plasmaquellen als Medizinprodukt. Links: PlasmaDerm (Bildquelle: ©Cinogy GmbH, <a href="http://www.cinogy.de/_DE/index.php">http://www.cinogy.de/_DE/index.php</a> ), rechts: kINPenMed (Bildquelle: ©neoplas tools GmbH, <a href="http://www.neoplas-tools.eu/patienten.html">http://www.neoplas-tools.eu/patienten.html</a> ). .....	2
Abbildung 2: Die flüssigkeitsvermittelte Wirkung des Plasmas auf die Zelle (Bildquelle: ©INP Greifswald). .....	3
Abbildung 3: Zeitstrahl der Antibiotikaentdeckungsgeschichte <sup>(68)</sup> .....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Elektrodensystems (links), Epoxidharz-basierte Elektrode im Plasma-OFF-Modus (Mitte), Epoxidharz-basierte Elektrode im Plasma-ON-Modus (rechts). .....	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung der elektronischen Ansteuerung der Epoxidharz-basierten DBE 1. ....	12
Abbildung 6: Darstellung des komplexen Pulsmusters der Epoxidharz-basierten DBE 1. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Pulse und der experimentell ermittelten Pulsformen. Hierbei steht Puls <sub>int</sub> für interner Puls und Puls <sub>ext</sub> für externer Puls. ON bezeichnet den Plasma-ON-Zustand, während OFF für den gegensätzlichen Plasma-OFF Zustand steht. ....	13
Abbildung 7: Darstellung der elektronischen Laboransteuerung zum Betreiben von zwei parallel angeschlossenen Epoxidharz-basierten DBE 2. ....	14
Abbildung 8: Darstellung des komplexen Pulsmusters der Epoxidharz-basierten DBE 2, welches mit einer neu zusammengestellten Laboransteuerung generiert wird. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Pulse und die experimentell ermittelten Pulsformen. Puls <sub>int</sub> steht hierbei für den internen Puls, während Puls <sub>ext</sub> für den externen Puls steht. ON bezeichnet den Plasma-ON-Zustand und OFF den gegensätzlichen Plasma-OFF-Zustand. .....	14
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Elektrodensystems (links), Keramik-basierte Elektrode im Plasma-OFF Modus (Mitte), Keramik-basierte Elektrode im Plasma-ON Modus (rechts). .....	16



Abbildung 10: Schematische Darstellung der elektronischen Ansteuerung zum Betreiben der Keramik-DBE.....	17
Abbildung 11: Darstellung des Pulsmusters der Keramik-basierten DBE. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Pulse und die experimentell ermittelten Pulsformen. ON bezeichnet den Plasma-ON Zustand und beträgt 100 ms. Da die zeitliche Länge eines/einer Pulspaketes/Periode 1 s beträgt, entspricht die Dauer des Plasma-OFF Zustandes 900 ms. ...	17
Abbildung 12: Behandlung von 5 ml Flüssigkeit durch den kINP09 mit Gasschutzmantel (links) und die schematische Darstellung des kINPen09 mit Gasschutzmantel (rechts, angepasste Darstellung aus Ref. (35) © [2012] IEEE).....	18
Abbildung 13: Ablauf der mikrobiologischen Untersuchungen mit plasmabehandelter NaCl-Lösung (links; indirekte Plasmabehandlung) bzw. mit plasmabehandelten Bakteriensuspensionen (rechts, direkte Plasmabehandlung) mit $t_1$ (Plasmabehandlungszeit), $t_2$ (Zeitpunkt der Beimpfung nach Plasmabehandlung) und $t_3$ (Einwirkzeit bzw. Kontaktzeit) als zeitlich variable Parameter. ....	19
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Anwendungs- bzw. Messprinzips für die OES Messungen an den DBE. ....	21
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Bestimmung von nicht geladenen Spezies in der Gasphase mittels FTIR-Spektroskopie. ....	22
Abbildung 16: Ablaufende chemisch Reaktionen und entsprechende Reaktionsprodukte des Wasserstoffperoxidnachweises mit schwefelsaurer Titanylsulfat-Lösung. ....	24
Abbildung 17: Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Wasserstoffperoxidnachweises mit schwefelsaurer Titanylsulfat-Lösung in Wasser. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit $n = 9$ . ....	25
Abbildung 18: Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Wasserstoffperoxidnachweises mit schwefelsaurer Titanylsulfat-Lösung in NaCl-Lösung. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit $n = 9$ . ....	26
Abbildung 19: Ablaufende chemisch Reaktionen und entsprechende Reaktionsprodukte des Spectroquant®-Nitrat-Tests. ....	27

Abbildung 20: Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Spectroquant®-Nitrattests in Wasser. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit n = 9. ....	28
Abbildung 21: Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Spectroquant®-Nitrattests in NaCl-Lösung (0,85 %). Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit n = 9. ....	29
Abbildung 22: Ablaufende chemische Reaktionen und entsprechende Reaktionsprodukte des Spectroquant® Nitrit-Tests. ....	30
Abbildung 23: Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Spectroquant®-Nitrittests in Wasser. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit n = 9. ....	31
Abbildung 24: Kalibrierung des SPECORD® S600 Spektralphotometers auf das Endprodukt des Spectroquant®-Nitrittests in NaCl-Lösung (0,85 %). Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit n = 9. ....	31
Abbildung 25: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von Escherichia coli-Bakterien(77). Quelle: NIH – National Institute of Allergy and Infectious Diseases, <a href="http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/publicmedia/Pages/image_library.aspx">http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/publicmedia/Pages/image_library.aspx</a> . ....	32
Abbildung 26: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von Staphylococcus aureus-Bakterien. (Bildquelle: CDC - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (ID# 11154), <a href="http://phil.cdc.gov/phil/details.asp">http://phil.cdc.gov/phil/details.asp</a> ). ....	34
Abbildung 27: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von zwei grampositiven Staphylococcus epidermidis-Bakterien. Quelle: CDC - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (ID# 259), <a href="http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=259">http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=259</a> . ....	35

Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von gramnegativen Pseudomons aeruginosa-Bakterien. Quelle: CDC - Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (ID# 232).....	37
Abbildung 29: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von Candida albicans-Hefepilzen. Quelle: Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, <a href="http://www.igb.fraunhofer.de/de/presse-medien/presseinformationen/2010/pathogene-hefen.html">http://www.igb.fraunhofer.de/de/presse-medien/presseinformationen/2010/pathogene-hefen.html</a> .....	38
Abbildung 30: Schematische Darstellung einer 1:10 Verdünnungsreihe. ....	44
Abbildung 31: Schematische Darstellung des Ablaufes der One-Color microarraybasierte Genexpressionsanalyse.....	50
Abbildung 32: Schematische Darstellung der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung. ....	57
Abbildung 33: In Luft, oberhalb einer mit 5 ml NaCl-Lösung gefüllten Petrischale, aufgenommene optische Emissionsspektren von epoxidharzbasierter DBE (a) und keramikbasierter DBE (b) <sup>(69)</sup> .....	63
Abbildung 34: FTIR-Transmissionsspektren des Abgases der epoxidharzbasierten DBE (a) und keramikbasierten DBE (b), welche mit komprimierter Luft bei einer Gasflussrate von 1 slm oberhalb einer leeren Petrischale betrieben wurden. Ebenfalls dargestellt sind die Spektren, die zur Identifizierung der Spezies mit dem QMACSoft HT Simulations- und Fitprogramm erhaltenen wurden <sup>(69)</sup> .....	65
Abbildung 35: FTIR-Transmissionsspektren des abgeleiteten Gases der keramikbasierten DBE, welche unter trockenen (a) und sehr feuchten (b) Betriebsbedingungen bei einer Gasflussrate von 0,5 slm, aufgezeichnet wurden. Ebenfalls dargestellt sind die Spektren, die zur Identifizierung der Spezies mit dem QMACSoft HT Simulations- und Fitprogramm erhaltenen wurden.....	67
Abbildung 36: In destilliertem Wasser gemessene a) pH-Werte und Konzentrationen von b) NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mg/l], c) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mg/l] und d) NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/l] in Abhängigkeit von der Behandlungszeit t <sub>1</sub> [min], welche nach Behandlung mit epoxidharz- und keramikbasierter DBE aufgezeichnet wurden <sup>(69)</sup> . Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindesten drei unabhängig voneinander	

durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben. ....	69
Abbildung 37: Durch epoxidharz- und keramikbasierter DBE induzierte Wachstumshemmung von <i>E. coli</i> in Abhängigkeit von der CAP-Behandlungszeit $t_1$ [min]. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben. ....	71
Abbildung 38: Vitalität von <i>E. coli</i> in 0,85 %iger NaCl-Lösung in Korrelation mit der CAP-induzierten pH-Verschiebung (x-Achse) in den sauren Bereich. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben. ....	72
Abbildung 39: Vitalität von <i>E. coli</i> in salzsauer NaCl-Lösung (pH 2,6) in Abhängigkeit zur Einwirkzeit $t_3$ [min]. ....	73
Abbildung 40: Vitalität von <i>E. coli</i> in salpetersaurer NaCl-Lösung (pH 2,6) in Abhängigkeit zur Einwirkzeit $t_3$ [min]. ....	73
Abbildung 41: In destilliertem Wasser gemessene pH-Werte in Abhängigkeit von der Behandlungszeit $t_1$ [min], die nach Behandlung mit epoxidharz- und keramikbasierter DBE in Argonatmosphäre aufgezeichnet wurden. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben. ....	74
Abbildung 42: In destilliertem Wasser gemessene $H_2O_2$ -Konzentrationen [mg/l] in Abhängigkeit von der Behandlungszeit $t_1$ [min], welche nach Behandlung mit epoxidharz- und keramikbasierter DBE in Argonatmosphäre aufgezeichnet wurden. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben. ....	75
Abbildung 43: Vitalität von <i>E. coli</i> in 0,85 %iger NaCl-Lösung in Abhängigkeit von der CAP-Behandlungszeit $t_1$ [min] unter Verwendung verschiedener Schutzgasatmosphären <sup>(112)</sup> . Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). ....	78

- Abbildung 44: pH-Werte (a) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen (b) von 0,85% NaCl-Lösung nach 10 min CAP-Behandlung mit unterschiedlichen Schutzgaszusammensetzungen<sup>(112)</sup>. Die entsprechenden Konzentrationen sind als Funktion des prozentualen Sauerstoffanteils im sauerstoff- und/oder stickstoffhaltigen Gasschutzmantel dargestellt. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ . ..... 78
- Abbildung 45: Nitrit- und Nitratkonzentrationen von 0,85 % NaCl-Lösung nach 10 min CAP-Behandlung mit unterschiedlichen Schutzgaszusammensetzungen. <sup>(112)</sup>. Streuungen um den Mittelwert sind als Standardabweichungen aufgetragen mit  $n = 9$ . ..... 80
- Abbildung 46: Vitalität von *E. coli* in CAP-behandelter NaCl-Lösung in Abhängigkeit von der Plasmabehandlungszeit der Flüssigkeit ( $t_1$ ). Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindesten drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben..... 90
- Abbildung 47: Relevanz der Einwirkzeit auf die Mikroorganismen ( $t_3$ , min) auf die keimreduzierende Wirkung von NaCl-Lösung nach 5 min CAP-Behandlung. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindesten drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben..... 91
- Abbildung 48: Vitalität von *E. coli* in 3-6 min CAP-behandelter NaCl-Lösung nach 30 min Wartezeit in Abhängigkeit von der Einwirkzeit ( $t_3$ )<sup>(49)</sup>. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindesten drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Minimal- und Maximalwerte angegeben..... 92
- Abbildung 49: Chemische Zusammensetzung von 4 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen ( $\text{pH} = 2,7$ ). Die Mittelwerte der  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen sind in Abhängigkeit von der Wartezeit ( $t_2$ ) wiedergegeben. Streuungen sind als Standardabweichungen angegeben<sup>(49)</sup>. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindesten drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben. .... 94
- Abbildung 50: Chemische Zusammensetzung von 5 min CAP-behandelten NaCl-Lösungen ( $\text{pH} = 2,6$ ). Die Mittelwerte der  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen sind in Abhängigkeit von der Wartezeit ( $t_2$ ) wiedergegeben. Streuungen sind als Standardabweichungen angegeben<sup>(49)</sup>. Abgebildete Werte sind Mittelwerte aus mindesten drei unabhängig voneinander

durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). Streuungen um die Mittelwerte sind als Standardabweichungen angegeben. .... 95

Abbildung 51: Gensequenz mit der die SOS-Antwort durch UV-Strahlung aktiviert wird. . 104

Abbildung 52: Vitalität von *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermides*, *P. aeruginosa* und *C. albicans* in 5 min CAP-behandelter NaCl-Lösung. Die Anzahl der KbE/ml ist in Abhängigkeit von der Einwirkzeit  $t_3$  (min) der plasmabehandelten NaCl-Lösung auf die Mikroorganismen dargestellt. Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ )..... 113

Abbildung 53: Untersuchungen zur Ermittlung einer möglichen erworbenen Resistenz von *E. coli* gegenüber wiederholt applizierten CAP-behandelten NaCl-Lösungen auf rekultivierte Bakterienkolonien. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung der  $\text{Log}_{10}$ -Reduktionsfaktoren (Rf) von 1-4 min plasmabehandelten NaCl-Lösungen. Die Einwirkzeit bei den ersten 1-8 Plasmabehandlungen (PB) betrug 5 min, bei der 9. PB betrug sie 15 min und bei der 10. PB 20 min<sup>(49)</sup>. Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ )..... 115

Abbildung 54: Durchmesser der Hemmhöfe [mm] von Amikacin, Ampicilli, Cefazolin und Gentamicin nach vorheriger Behandlung von *E. coli* mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen ( $t_1 = 1,5$  min;  $t_3 = 15$  min). PB = Plasmabehandlung. Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). .... 119

Abbildung 55: Durchmesser der Hemmhöfe [mm] von Tetracyclin, Ticarcillin, Tobramycin und Trimethoprim nach vorheriger Behandlung von *E. coli* mit CAP-behandelten NaCl-Lösungen ( $t_1 = 1,5$  min;  $t_3 = 15$  min). PB = Plasmabehandlung. Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ ). .... 119

Abbildung 56: Durchmesser der Hemmhöfe [mm] von Amikacin, Ampicilli, Cefazolin und Gentamicin nach direkter Behandlung der *E.-coli* Suspension mit CAP ( $t_1 = 3$  min,  $t_3 = 0$  min). Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ )..... 120

Abbildung 57: Durchmesser der Hemmhöfe [mm] von Tetracyclin, Ticarcillin, Tobramycin und Trimethoprim nach direkter Behandlung der *E.-coli* Suspension mit CAP ( $t_1 = 3$  min,  $t_3 = 0$  min). Dargestellte Werte sind Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ( $n \geq 9$ )..... 121

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien und Chemikalien für die nass-chemischen Analysenverfahren .....	23
Tabelle 2: Für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendeten <i>Escherichia-coli</i> -Laborstämme mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordert vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. ....	33
Tabelle 3: Der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendete <i>Staphylococcus aureus</i> Laborstamm mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordert vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. ....	35
Tabelle 4: Der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendete <i>Staphylococcus epidermidis</i> Laborstamm mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordert vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. ....	36
Tabelle 5: Der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendete <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Laborstamm mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordert vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. ....	37
Tabelle 6: Der für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendete <i>Candida albicans</i> Hefepilz mit den entsprechenden Kultivierungsbedingungen. Geordert vom Leibniz Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell-kulturen GmbH. ....	39
Tabelle 7: Verwendete Reagenzien und Chemikalien für die mikrobiologischen Analysenverfahren .....	39
Tabelle 8: Bestandteile und Zusammensetzung vom WT Primer Master Mix. ....	50
Tabelle 9: Bestandteile und Zusammensetzung vom cDNA Master Mix. ....	51
Tabelle 10: Bestandteile und Zusammensetzung vom Transcription Master Mix. ....	51
Tabelle 11: Ausbeuten und spezifische Aktivitäten für die Hybridisierung der entsprechenden Microarrays. ....	53



Tabelle 12: Bestandteile, Volumina und Massen des Fragmentationsgemisches. ....	53
Tabelle 13: Bestandteile und Konditionen der Waschbäder für die hybridisierten Microarrays. .....	54
Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung der Materialien und elektrischen Betriebsparameter von epoxidharz- und keramikbasierter DBE <sup>(69)</sup> . ....	61
Tabelle 15: Durch FTIR-spektroskopische Analyse detektierte Moleküle innerhalb der Plasmagasphase mit entsprechenden Konzentrationen bei unterschiedlichen Gasflussraten, mit denen die keramikbasierte bzw. epoxidharzbasierte DBE betrieben wurden <sup>(69)</sup> . ....	66
Tabelle 16: Chemische Zusammensetzung von destilliertem Wasser nach 30-minütiger CAP- Behandlung mit epoxidharz- und keramikbasierter DBE <sup>(69)</sup> . ....	70
Tabelle 17: Prozentuale Zusammensetzung des verwendeten Gasschutzmantels zur Bestimmung der keimreduzierenden Effekte des kINPen09. ....	77
Tabelle 18: Verhältnisse der Konzentrationen von NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> zu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in NaCl-Lösung, nach 4 bzw. 5 min CAP-Behandlung (t <sub>1</sub> ), bei unterschiedlichen Wartezeiten (t <sub>2</sub> ) <sup>(49)</sup> . ....	96
Tabelle 19: Liste der unterschiedlich exprimierten Gene in E. coli nach direkter und indirekter CAP-Behandlung. Angegeben ist der Faktor, um den das entsprechende Gen hoch- (+) bzw. herunter (-) reguliert ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowie die kodierte Funktion. .....	98

## **11 Tabellarischer Lebenslauf**

## 12 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgenden **Publikationen** veröffentlicht:

Hänsch M, Winter J, Bussiahn R, Weltmann KD, von Woedtke T. A systematic characterization of a novel surface dielectric barrier discharge for biomedical experiments. *PlasmMed.* 2013;3(1-2):27-44.

Hänsch MAC, Mann M, Weltmann KD, von Woedtke T. Analysis of antibacterial efficacy of plasma-treated sodium chloride solutions. *Journal of Physics D: Applied Physics.* 2015;48(45):454001.

Jablonowski H <sup>a)</sup>, Hänsch MAC <sup>a)</sup>, Dünnbier M, Wende K, Hammer MU, Weltmann KD, Reuter S, von Woedtke T. Plasma jet's shielding gas impact on bacterial inactivation. *Biointerphases.* 2015;10(2):029506.

<sup>a)</sup> Jablonowski H and Hänsch MAC have contributed equally to this work

### **Konferenzbeiträge:**

#### Proceeding Paper:

Kovačević VV, Hänsch M, Brandenburg R, von Woedtke T, Obradović BM, Sretenović GB, Kuraica MM. Antimicrobial Activity of Sodium Chloride Solutions Treated in Water Falling Film DBD Reactor (Poster + Proceeding paper). XIIIth International Symposium on High Pressure Low Temperature Plasma Chemistry (HAKONE XIII), Poland from September 9 - September 14, 2012

Hänsch MAC, Weltmann KD, von Woedtke T. Analysis of Biological Responses to Plasma-Treated Sodium Chloride Solutions. 21<sup>st</sup> International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC 21) in Cairns, Australia from 04-09 August, 2013

#### Poster:

Oehmigen K, Hänsch M, Weltmann KD, von Woedtke T. Influence of Volume Dielectric Barrier Discharge in Argon and Argon-Oxygen-Atmospheres on Water and *E. coli* Suspensions. The 38th IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS), USA from June 26 – June 30, 2011

Hänsch M, von Woedtke T, Oehmigen K, Weltmann KD. Analysis of the long-time lethal Effects of Plasma treated Sodium Chloride Solutions. 4th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-4), France from June 17 – June 21, 2012

Tresp H, Hammer MU, Wende K, Hänsch M, Winter J, Schmidt-Bleker A, Masur K, von Woedtke T, Weltmann KD, Reuter S. Plasma-generated reactive species in liquids by a gas shielded atmospheric pressure plasma jet effluent. Europhysics Conference on the Atomic and Molecular Physics of Ionized Gases (ESCAMPIG2012), Portugal from 10-14 July 2012.

Hammer MU, Tresp H, Schmidt-Bleker A, Winter J, Hänsch M, Wende K, Schaper L, Graham B, Masur K, von Woedtke T, Weltmann KD, Reuter S. Liquid Mediated Effects on Cells, Bacteria, and Model Membranes by Plasma-born Reactive Species. 4th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-4), France from June 17 – June 21, 2012

Tresp H, Hammer MU, Schmidt-Bleker A, Winter J, Hänsch M, Wende K, Schaper L, Graham B, Masur K, von Woedtke T, Weltmann KD, Reuter S. Plasma-Generated Reactive Species in physiological Solutions. 4th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-4), France from June 17 – June 21, 2012

Reuter S, Winter J, Hammer MU, Masur K, Wende K, Schmidt-Bleker A, Tresp H, Hänsch M, Dünnebier M, Iseni S, von Woedtke T, Weltmann KD. Diagnostic and Design of Plasma Generated Reactive Species in Liquids to Investigate Cellular Effects of Plasma Treatment. 4th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-4), France from June 17 – June 21, 2012

Hänsch M, Weltmann KD, von Woedtke T. Analysis of Antimicrobial Effects of Plasma-Treated Liquids. 16. Fachtagung für Plasmatechnologie (PT 16), Deutschland vom 18 – 20 Februar, 2013

Hänsch M, Weltmann KD, von Woedtke T. Bacteria Show Increased Susceptibility to Antibiotics and No Resistance by Repetitive Atmospheric Pressure Plasma Application. 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-5), Nara, Japan from 18 – 23 May 2014

Vorträge:

Hänsch M, Weltmann KD, von Woedtke T. Novel surface dielectric barrier discharge for basic research in plasma medicine. International Conference on Plasma Science (ICOPS), San Francisco, USA from June 16 – 21, 2013

Hänsch MAC, Weltmann KD, von Woedtke T. Analysis of Biological Responses to Plasma-Treated Sodium Chloride Solutions. 21<sup>st</sup> International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC 21) in Cairns, Australia from 04-09 August, 2013

## **13 Eigenständigkeitserklärung**

## 14 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas von Woedtke** für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung und das unermüdliche in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für die vielen Möglichkeiten bei denen ich meine Ergebnisse auf internationalen wie auch nationalen Konferenzen oder Tagungen präsentieren durfte.

Für die tolle Zusammenarbeit würde ich gerne meine Wertschätzung gegenüber den INP-Mitarbeitern **Dr. René Bussihan, Dr. Jörn Winter, Dr. Helena Jablonowski, Dr. Thorsten Gerling, Dr. Anke Schmidt** und **Michael Schmidt** aussprechen. Ohne diese fruchtbaren Kooperationen wären viele der gewonnenen Ergebnisse nicht zustande gekommen.

Für die technische und praktische Unterstützung bei meinen Versuchen bedanke ich mich recht herzlich bei **Rüdiger Tietze, Christiane Meyer** sowie **Kristin Loyal**.

Ein großer Dank gebührt **Dr. Stefan Hamann, Dr. Birte Holtfreter** und **Dr. Kristin Fredrich**, die sich die Mühe gemacht haben meine Arbeit sorgfältig zu lesen, zu korrigieren und mir mental beizustehen.

Mein größter Dank gilt ohne Frage meinem Mann **Philipp** sowie meinem Sohn **Hagen**. Danke, dass es euch gibt und ihr mein Leben noch schöner macht. Im gleichen Maße möchte ich meinem Vater **Paul** und meiner verstobenen Mutter **Heidrun** danken, ohne euch wäre dies alles nicht möglich gewesen.